

**Haemostaseologische Untersuchungen zur postoperativen
Bauchwanddehiszenz
— Eine prospektive Studie —**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Klaus Schaarschmidt

München 1979

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0052

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt

der Universität München

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

Haemostaseologische Untersuchungen zur postoperativen

Bauchwanddehiscenz

- Eine prospektive Studie -

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Schaarschmidt

aus

Siegsdorf / Bayern

Jahr

München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Mitberichterstatter: - / -

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 03. 80



Herrn Prof. Dr. R. Marx danke ich für die Stellung
des Themas

Herrn Dr. Schramm danke ich sehr herzlich für die
ständige Förderung der Arbeit

Herrn Dr. Schmidtler danke ich für die Organisation
des klinischen Teils der Studie

Den Damen des Labors von Herrn Prof. Dr. R. Marx,
besonders Frau Weiß, danke ich für die Bestimmung
der haemostaseologischen Routineparameter

INHALTSVERZEICHNIS

=====

A.	EINLEITUNG	1
1.	Geschichte	
2.	Klinisches Bild	
3.	Theorien zur Ätiologie	
3.1	Chirurgisch-mechanische Faktoren	
3.2	Lokale Faktoren	
3.3	Medikamente	
3.4	Allgemeine Faktoren	
3.5	Haemostaseologische Faktoren	
4.	Gruppeneinteilung unserer Patienten	
B.	METHODEN	7
1.	Allgemein	
2.	Quantitative Immunelektrophorese nach Laurell	
2.1	Material	

2.2	Methodik
2.2.1	Geschichte
2.2.2	Prinzip
2.2.3	Technisches Vorgehen
2.2.3.1	Herstellung des Agarosegels
2.2.3.1.1	Wahl der Agarose
2.2.3.1.2	Wahl des Puffers
2.2.3.1.3	Herstellung gebrauchsfertiger Gelportionen
2.2.3.2	Gießen antikörperhaltiger Agaroseplatten
2.2.3.2.1	Antiseren
2.2.3.2.2	Kleine Platten
2.2.3.2.3	Große Platten
2.2.3.2.4	Haltbarkeit fertiger Gelplatten
2.2.3.2.5	Lochen der Platten
2.2.3.3	Durchführung der Elektrophorese
2.2.3.3.1	Eichkurve
2.2.3.3.2	Verdünnen der Proben
2.2.3.3.3	Vorbereitung der Elektrophoresekammer mit den Gelplatten
2.2.3.3.4	Auftragen der Proben und Ablauf der Elektrophorese
2.2.3.3.5	Kühlung
2.2.3.4	Weiterbehandlung der Platten
2.2.3.4.1	Pressen
2.2.3.4.2	Trocknen
2.2.3.4.3	Färben
2.2.3.4.4	Auswertung
2.2.3.4.5	Dokumentation
2.2.4	Technische Probleme
2.2.4.1	Ungleiche Geldicke
2.2.4.2	Randphänomene
2.2.4.3	Kühlung
2.2.4.4	Auftragszeit
2.2.5	Fehlerkontrolle
2.2.6	Qualitätskontrolle

C.	ERGEBNISSE	38
1.	Methodische Ergebnisse	
1.1	Normalwerte für die Methodik nach Laurell	
1.2	Methodenvergleich	
2.	Bestimmungen bei chirurgischen Patienten	
2.1	Blutbild	
2.1.1	Haemoglobin und Haematokrit	
2.1.2	Leukozyten	
2.1.3	Gesamteiweiß	
2.2	Globaltests	
2.2.1	Quickwert	
2.2.2	Partielle Thromboplastinzeit	
2.2.3	Thrombinzeit	
2.3	Thrombozyten	
2.4	Gerinnungsfaktoren	
2.4.1	Fibrinogen und Fibrinmonomere	
2.4.1.1	Hitze-fibrinogen nach Schulz	
2.4.1.2	Äthanoltest nach Godal	
2.4.2	Alpha ₂ -Makroglobulin nach Laurell	
2.4.3	Alpha ₁ -Antitrypsin nach Laurell	
2.4.4	Faktor-VIII-assoziertes Antigen nach Laurell	
2.4.5	Antithrombin III nach Laurell	

2.4.6	Faktor XIII	
2.4.6.1	Bestimmung nach Laurell	
2.4.6.2	Bestimmung nach Bohn und Haupt	
D.	DISKUSSION	55
1.	Methodenvergleich	
2.	Klinische Einschätzung des Risikos für Wunddehiszenzen	
3.	Blutbild	
3.1	Haemoglobin und Haematokrit	
3.2	Leukozyten und Infektion	
4.	Globaltests	
5.	Thrombozyten und Thrombozyten-Faktor XIII	
6.	Gerinnungsfaktoren	
6.1	Faktor XIII	
6.2	Fibrinogen und Wunddysthrombie	
6.3	Antithrombine und Antiplasmin	
6.3.1	Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin	
6.3.2	α_1 -Antitrypsin und Fibrinolyse	
6.4	Faktor-VIII-assoziiertes Antigen	

7.	Ursachen und Wirkungen der Wunddystthrombie	
7.1	Ursachen	
7.2	Wirkungen auf das Fibroblastenwachstum	
8.	Zusammenfassung	
E.	ZUSAMMENFASSUNG	66
F.	LITERATURVERZEICHNIS	67

A . E I N L E I T U N G

=====

1. GESCHICHTE

Die Bauchwanddehiszenz, als gravierendste Form der postoperativen Wundheilungsstörungen gab immer wieder Anlaß zu ätiologischen Spekulationen, seit Madelung 1905 die erste Sammelstatistik publizierte; 1932 meinte Sokolow, statistisch nachweisen zu können, daß bei Kopfarbeitern die Häufigkeit von Bauchwandrupturen zwischen der von Landarbeitern und Matrosen liege ⁴⁹⁾.

Trotz der Entdeckung von Sulfonamiden und Antibiotika hat sich die Inzidenz bis heute nicht geändert. Sie liegt nach wie vor zwischen 0,3 und 3 % bei einer Letalität von 20 bis 40 % ^{14) 22) 48)}.

2. KLINISCHES BILD

Die Bauchwanddehiszenz (synonym: Bauchwandruptur, Platzbauch) zeigt sich klinisch als postoperatives Auseinanderweichen, zunächst des Peritoneaeums, dann der übrigen Bauchwandschichten von innen nach außen ohne primäre Infektion; sekundäre Keimbesiedlungen können allerdings in vielen Fällen nachgewiesen werden. Da der Ausdruck Platzbauch sachlich nicht ganz zutrifft, prägte Block den Begriff "Wunddehiszenz" ⁶⁾. Die Bauchwandruptur tritt jedoch entgegen der ursprünglichen Definition nicht ganz "symptomenlos" auf. Als wichtigstes Frühsymptom wurden Serome in rund 50 % der Fälle beobachtet, während die subcutane Bauchwanddehiszenz das unmittelbare darstellt ^{8) 9) 13) 14) 22) 45) 48) 49)}.

3. THEORIEN ZUR ÄTIOLOGIE

Die Vielfalt der Theorien verdeutlicht, daß die Ätiologie der Bauchwandruptur bisher noch nicht geklärt werden konnte. Zusammenfassend lassen sich die diskutierten Ursachen in chirurgisch - mechanische, lokale, medikamentöse und allgemeine Faktoren unterteilen.

3.1 CHIRURGISCH - MECHANISCHE FAKTOREN

Primär ist die Bauchwandruptur ein mechanisches Problem, als Mißverhältnis der angreifenden Kräfte und der Festigkeit des Wundverschlusses. 60 % aller Wunddehissenzen treten im Zusammenhang mit starkem Husten oder Erbrechen auf. Dabei tritt intraabdominell das Zehnfache des Normaldruckes auf. Bedenkt man, daß die Wandspannung angenähert der Fläche des horizontalen Querschnittes proportional ist, so wird klar warum Fettleibigkeit ein wichtiger Risikofaktor ist. 22) 31) 48) Entsprechend richtete sich das Augenmerk anfangs vor allem auf mögliche technische Ursachen eines fehlerhaften Wundverschlusses wie Schnittführung, Nahtmaterial, Nähetechnik und andere mehr.

3.2 LOKALE FAKTOREN

Zusätzlich zur passiven Festigkeit durch chirurgischen Wundverschluß dachte man bald auch an die Eigenfestigkeit der Schnittwunde durch aktive Reparationsvorgänge, die der Chirurg durch optimale Technik (möglichst atraumatisches Operieren, gut durchblutete Wundränder, saubere Adaptation, optimale und möglichst gleiche Fadenspannung etc.) zwar fördern, letztlich aber selbst nicht beeinflussen kann. Schon nach dem dritten postoperativen Tag, also wesentlich früher als ursprünglich angenommen, beginnt bei gut vaskularisiertem Wundrand eine rasch zunehmende Reißfestigkeit der

Wunde. 1) 8)

Nun erkannte man auch den Einfluß lokaler Faktoren wie der proteolytischen Fermente, der Kinine und Mediatoren. In diesem Zusammenhang ist gleichfalls die leukotaktische Wirkung des Fibrinogenspaltproduktes Y von Bedeutung. ⁴²⁾

3.3 MEDIKAMENTE

Ferner werden mögliche Nebenwirkungen von Medikamenten oft unterschätzt: Analgetika, Antikoagulantien, Antiphlogistika und Antibiotika können mit Gerinnung, Entzündung und Regeneration notwendige Heilungsstufen hemmen. ^{1) 14)}

3.4 ALLGEMEINE FAKTOREN

Die meisten Autoren weisen jedoch darauf hin, daß keine der vorhergenannten Ursachen geeignet sei, das Phänomen der Bauchwandruptur allein hinreichend zu erklären. So nahm man bald an, daß es sich um eine Krankheit des ganzen Körpers handle, und begann dementsprechend zielstrebig nach allgemeinen Risikofaktoren zu suchen.

Schmidtler und Mitarbeiter konnten in einer retrospektiven Studie an 324 Patienten, die zwischen 1955 und 1974 an der Chirurgischen Klinik der Universität München eine Bauchwanddehiszenz erlitten, Kriterien erarbeiten, die unseres Erachtens erlauben, das prae- und postoperative Risiko einer Bauchwandruptur abzuschätzen. ⁴⁵⁾

Tabelle 1

Ermittelte Risikofaktoren bei der Auswertung von 324 Patienten
mit einer postoperativen Bauchwanddehiscenz (München, 1955-74)

Präoperative Risikofaktoren	Intraoperative Risikofaktoren
1. Maligne Bauchkrankung	1. Relaparotomie
2. Entzündliche Bauchkrankung	2. Operationsdauer über 3h
3. Reduzierter Allgemeinzustand	3. Blutverlust über 2l
4. Blutung (Hb unter 10%)	4. Bakterielle Aussaat
5. Volumenmangelschock	
6. Ileus	
7. Peritonitis	
Normales Risiko (Gruppe I) :	weniger als 5 Faktoren
Erhöhtes Risiko (Gruppe II) :	mehr als 5 Faktoren

Dieser signifikante Einfluß allgemeiner Faktoren, die im Wesentlichen die Schwere der Erkrankung bzw. Operation widerspiegeln, eröffnet die Frage nach dem wirksamen Mechanismus.

3.5 HAEMOSTASEOLOGISCHE FAKTOREN

Operationstechnische Fehler kommen hier weniger in Frage, es sei denn, sie häuften sich besonders bei schwerkranken Patienten. Duckert beobachtete 1960, daß der Mangel eines fibrinstabilisierenden Faktors die Wundheilung beeinträchtigt ¹⁵⁾. 1965 fand Thies in einer Faktor XIII - Verminderung eine mögliche Ursache postoperativer Wundrupturen. Inzwischen berichteten mehrere Autoren über eine klinisch bessere Wundheilung nach Substitution von Faktor XIII ^{19) 54) 58)}. Cassau berichtet bei 30 % seiner Patienten mit Wundruptur über thromboembolische Komplikationen und hält die Verän-

derungen der Gerinnungsfaktoren für abhängig vom Schweregrad der Operation; gleichzeitig weist er auf die Bedeutung der Fibrinolyse hin ¹³⁾. Diese Ergebnisse erhellen bereits die wesentliche Rolle der Hämostase bei intakter und gestörter Wundheilung.

Ziel dieser Arbeit war, den Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und postoperativer Bauchwanddehiszenz klarer zu erkennen. Wir wollten insbesondere untersuchen, ob Faktor XIII wirklich der einzige ätiologisch wichtige Faktor ist oder nicht vielleicht nur Ausdruck einer groben Hämostasestörung schwerkranker Patienten ^{9) 47)}.

4. GRUPPENEINTEILUNG UNSERER PATIENTEN

Wir untersuchten daher in einer prospektiven Studie ein breites Spektrum von hämostaseologischen Parametern mit dem Ziel, mögliche Zusammenhänge zwischen Bauchwanddehiszenz und Hämostasopathien zu erfassen. Nach den Kriterien von Schmidtler und Mitarbeitern ⁴⁵⁾ war es uns möglich, Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine Wundheilungsstörung zu erfassen.

Mit weniger als fünf Risikofaktoren ordneten wir die Patienten der Kontrollgruppe I zu. Patienten mit mehr als fünf Risikofaktoren sahen wir als gefährdet an und faßten sie in der Risikogruppe II zusammen. Wir konnten insgesamt 43 Patienten exakt auswerten (s. Tab. 2).

Keiner der Patienten aus der Normalgruppe I erlitt eine Wunddehiszenz, dagegen 12 Patienten der

Tabelle 2

Gruppeneinteilung von 43 prospektiv
kontrollierten Patienten nach einer
Laparotomie

	Gruppe I	Gruppe II
Risiko	normal	erhöht
n	15	28
primäre Wundheilung	15	16 (IIa)
postoperative Bauchwanddehiszenz	0	12 (IIb)

Risikogruppe II (= Untergruppe IIb). Die Wundruptur trat durchschnittlich am 6. postoperativen Tag auf. Bei den übrigen 16 Patienten der Gruppe II (= Untergruppe IIa) heilten die Wunden primär.

Für die Risikokriterien, Malignom, Alter über 50 Jahren und männliches Geschlecht fanden wir keine aussagekräftigen Unterschiede (s. Tab. 3).

Tabelle 3

Verteilung besonders wichtiger Risiko-
faktoren in unserem Krankengut

	Gruppe I	Gruppe IIa	Gruppe IIb
n	15	16	12
Malignompatienten	2	10	0
Patienten über 50 a	8	15	5
männliche Patienten	1	10	5

B . M E T H O D E N

=====

1. ALLGEMEIN

Neben Blutbild und blutchemischen Befunden kontrollierten wir prae- und postoperativ in zweitägigem Abstand die Laparatomiewunde und verschiedene hämostaseologische Parameter (s. Tab. 4).

Tabelle 4

Untersuchte Hämostaseologische Parameter

Tests nach unterschiedlichen Methoden	Sindefaktoren, mit der Immunelktrophorese nach LAURELL bestimmt
Quickwert (mit speziesspezifischer Humanthrombokinase)	Faktor XIII (zusätzlich nach BOHN und HAUPT)
Thrombinzeit	Antithrombin III
Thrombozyten (nach MARI)	Faktor VIII-Antigen
Fibrinogen (nach SCHULZ)	alpha ₁ -Antitrypsin
Partielle Thromboplastinzeit	alpha ₂ -Makroglobulin
Fibrinmonomere (+ -oligomere nach GODAL)	
Fibrinogenspaltprodukte (negh DUKS - Fa. Behring)	

2. QUANTITATIVE IMMUNELEKTROPHORESE NACH LAURELL

2.1 MATERIAL

Alle Geräte werden von der Firma Dansk Laboratoriestyr, Kopenhagen hergestellt. Der Vertrieb erfolgt durch die Behringwerke, Abteilungen der Farbwerke Höchst AG.

Elektrophoresekammer bestehend aus:

Trägerplatte mit Kühlschlange (unter Feldstärke 10 V/cm
16 - 20 °C, ab 10 V/cm 10 - 14 °C)

2 Platinelektroden

2 Puffertrögen (ausreichende Kapazität nötig für
konstanten pH - Wert)

Schutzbehälter

je ein Anschlußkabel rot = + und schwarz = -

Niveauregler

Gleichrichter mit Meßelektrodenpaar (70 - 280 V)

große Bechergläser (ca. 1l) für Wasserbäder

große Erlenmeyerkolben (300ml, 500ml und größer je nach
Bedarf) zum Erhitzen der Agarose

Bechergläser und Erlenmeyerkolben für 50ml, bzw. 50ml Pipetten

Reichlicher Vorrat an Reagensgläsern

Meßzylinder verschiedener Größen zum Abmessen des Puffers

Bunsenbrenner

Horizontaltisch mit Flüssigkeitslibelle (noch besser wäre
ein temperierbarer Horizontaltisch, den Behring aber nicht
anbietet)

Glasplatten 90x110x1,5 mm und 205x110x1,5 mm

U - Rahmen (für Platten 205x110x1,5 mm)

4 Bulldogklemmen

Schneidklingen 15,5cm lang beidseitig geschliffen

Föhn

2 Wasserbäder mit Thermostaten (temperiert auf 37 °C und 56 °C)

Analysenwaage zum Abwiegen der Agarose

Stanzschablone (79 Löcher in V - förmiger Anordnung)

Stanzkanülen mit Teleskop-Ansaugvorrichtung
(nach WEEKE und THOMSEN)

2,5 mm Durchmesser für 5 μ l

4,0 mm Durchmesser für 10 μ l

Owrens Veronalpuffer zum Verdünnen der Proben

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml

Ständer dafür

Satz Eppendorf-Doppelkonstriktionspipetten 10 - 1000 μ l

Glenco Micro-Syringe zum Auftragen der Proben

(Vertrieb durch Serva-Technik)

Drei oder mehr Plastikgefäße mit Deckel zum Färben

Plattenhalter für obige Plastikgefäße

Färbelösung: 50 g Coomassie Brilliant Blue R (Lieferant
(z.B. Edward Gurr, Ltd. London SW 14))

4,5 l Äthanol 96 %

1,0 l Eisessig

4,5 l aqua dest.

Vor Gebrauch filtrieren !

Äthanol-Entfärber zum Entfärben des Untergrundes:

entspricht der Färbelösung ohne Farbstoff

(Regeneration ist zwar auch durch Behandlung mit Aktiv-
kohle möglich aber wir wechselten die Lösung immer)

Puffer für die Elektrophoresekammer:

Ionenstärke $\mu = 0,02$ pH = 8,6

41,2 g Barbital-Natrium (5,5-Diäthylbarbitursäure-Na-Salz)

8,0 g Barbital (5,5-Diäthylbarbitursäure)

aqua bidest. ad 10 l

Ionenstärke $\mu = 0,075$ pH = 8,6 mit EDTA

131,4 g Barbital-Na

20,7 g Barbital

37,0 g EDTA

aqua bidest. ad 10 l

LITEX Agarose for Gel Electrophoresis

Type No: HSB

Batches: AGS 169, AGS 252, 0252

SERVA Agarose reinst, 11397 Control C für Lösungen 0,8 - 1,2 %

Antiseren (alle vom Kaninchen):

Faktor VIII-assoziiertes Antigen Behringwerke AG:

Batches: 2530 C, 2530 N, 2778 E, 5702 A, 5702 G

Antithrombin III Firma Nyegaard/Oslo: Batches 412050, 503051

Behringwerke AG: Batches 2714 U, 3902 D

alpha₁-Antitrypsin Behringwerke AG:

Batches: 2296 A, 2659 D, 2659 E, 2659 G, 2867 A

alpha₂-Makroglobulin Behringwerke AG:

Batches: 1623 B, 2520 D, 2520 G, 2520 N

Faktor XIII-Untereinheit A Behringwerke AG

Batches: 2421 F, 2421 H, 2434 D, 2434 H, 2677 C, 2677 K

2.2 METHODIK

2.2.1 Geschichte

1937 führte Tiselius die freie Elektrophorese ein ⁵⁵⁾, die Grabar, Williams und Scheidegger mit immunologischen Methoden kombinierten ^{21) 44)}. Mancini et al. veröffentlichten 1963 die radiale Immundiffusion, eine empfindliche und quantitative aber sehr zeitaufwendige Methode ³⁷⁾.

Schließlich entwickelte Laurell aus den beiden Verfahren 1966 den Elektroimmunoassay, der bei hoher Empfindlichkeit gut reproduzierbar und vergleichsweise schnell durchzuführen ist ³²⁾. Die Empfindlichkeit ist noch etwas höher als bei der radialen Immundiffusion, nur durch die Farbstoffintensität begrenzt und läßt sich daher durch radiographische Techniken noch mehr als verzehnfachen ²⁷⁾. Auch die Genauigkeit entspricht der Mancini Technik und ist am höchsten bei scharfer, innerer und äußerer Abgrenzung der Präzipitate, die sich bei Molekulargewichten zwischen 50 000 und 250 000 Dalton in der Regel am besten erreichen läßt ³³⁾.

2.2.2 Prinzip

Agarosegel wird mit monospezifischen Kaninchenantikörpern durchmischt und in einer gleichmäßigen Dicke von ca. 1 mm auf Glasplatten aufgetragen. In die Kathodenseite der Glasplatten stanzt man eine Reihe von Löchern mit gleichem Durchmesser und gleicher Tiefe. Über Filterpapierstreifen, zwei Puffertröge, in die langgestreckte Platinelektroden eintauchen und eine Gleichstromquelle erzielt man in dem Gel ein möglichst homogenes elektrisches Feld.

Der pH-Wert des Puffers ist mit 8,6 so gewählt, daß einerseits alle zu bestimmenden Plasmaproteine überwiegend

negative Ladungen tragen und so zur Anode wandern, andererseits die Antikörper im Gel an Ort und Stelle liegen bleiben ⁵⁵⁾.

Folglich sind alle Proteine bestimmbar, deren elektrophoretische Beweglichkeit sich von der der Antikörper im Gel unterscheidet; dies ist für alle, von uns bestimmten Gerinnungsproteine der Fall ⁴⁾.

Die angelegte Spannung wählt man so hoch, daß die Antigendiffusion gegenüber der elektrophoretischen Wanderung vernachlässigt werden kann ³³⁾. Das hat zwei Vorteile im Vergleich zur radialen Immundiffusion: Einerseits sind die Präzipitate genauer meßbar, da sie vollständig auf der anodischen Seite der Auftragsstelle liegen und so entsprechend höher werden, andererseits beschleunigt die Gleichstromspannung die Antigenwanderung und verkürzt so das Verfahren erheblich.

Von den Auftragslöchern im Gel wandern fast alle Proteine der eingefüllten Plasmaproben in anodischer Richtung. Das zu bestimmende Protein bildet zunächst mit den im Gel verteilten Antikörpern vermutlich schwer lösliche Komplexe (Complexing Phase), die aber noch mit verminderter Geschwindigkeit weiter wandern und sich bei Antigenüberschuß wieder auflösen können (eine besondere Eigenart der Kaninchenantikörper). Erst wenn die Antigenmoleküle die "äquivalente Menge Antikörper" binden, bilden sich stabile Immunkomplexe, die definitiv unlöslich sind (Phase der Aggregation und Präzipitation) ^{55) 56)}.

Diese "äquivalente Antikörpermenge" steht zuerst am Rande der Antigensäule zur Verfügung, wo auch die ersten Immunkomplexaggregate liegen bleiben. Sie bilden die feinen Seitenlinien der Präzipitate, die bei gut gefüllten Auftragslöchern tangential von diesen ausgehen und den Weg der Plasmaprobe rahmen.

Während sich am Rande bereits ein Gleichgewicht zwischen Antigen und Antikörpern einstellen kann, besteht im Zentrum noch ein deutlicher Antigenüberschuß, wodurch sich entstandene Immunkomplexe immer wieder auflösen und die Masse der

Antigenmoleküle mit gleicher Geschwindigkeit in Richtung des elektrischen Feldes weiter wandert ³³⁾. Da nun mit zunehmender Wegstrecke mehr und mehr Antigen an den Rändern des Präzipitates verbraucht wird, verschmälert sich die verbleibende Antigensäule bis sich die beiden Seitenlinien schließlich zu einer Spitze vereinigen, wenn auch die letzten Antigenmoleküle präzipitieren.

Die Präzipitathöhe ändert sich dann auch bei "zulanger" Elektrophoresezeit nicht mehr, da die präzipitierten Aggregate ja definitiv unlöslich sind.

Nähere Betrachtung verlangt noch der Begriff "äquivalente Menge Antikörper", oben immer in Anführungszeichen gesetzt. Er wurde von Heidelberg und Kendall nach Versuchen im Reagenzglas als die Antikörpermenge definiert, die mit einer konstant vorgegebenen Antigenmenge den maximalen Niederschlag ergibt ⁵⁶⁾.

Harboe und Inghild fanden aber bei der Reaktion in freier Lösung mehr als drei Mal so hohe Titer wie bei der Reaktion im Agarosegel, so daß hier die Aggregate hoch ungesättigt sein müssen ²³⁾. Daraus erklärt sich, daß eine Verlängerung der Laufzeit über die endgültige Präzipitation hinaus oder ein Nachdiffundieren lassen nach beendetem Elektroimmunoassay deutlich schärfere Präzipitate ergibt. Dies gilt natürlich für Kurzzeitimunelektrophoresen in noch höherem Maße.

Aus dem Gesagten wird deutlich, daß die Präzipitathöhe nur von der Antigenkonzentration abhängt, wenn vorausgesetzt werden darf, daß die übrigen Parameter der Anordnung für alle Proben gleich waren (s. Tab. 5)

Tabelle 5

Zusammenfassung der Faktoren mit Einfluß auf die Höhe der Präzipitate

-
1. Konzentration des Antigens
 2. Konzentration des Antiserums
 3. Feldstärke ($\frac{V}{cm}$)
 4. pH-Wert und Ionenstärke des Puffers
 5. Charge und Konzentration des Gels (Elektroendosmose)
 6. Elektrophoretische Beweglichkeit des Antigens
 7. Elektrophoresezeit
 8. Zeit vom Auftragen der Proben bis zum Beginn der Elektrophorese
-

nach WESKE 57)

2.2.3 Technisches Vorgehen

2.2.3.1 Herstellung des Agarosegels

2.2.3.1.1 Wahl der Agarose

Da die Qualitätsunterschiede handelsüblicher Präparate beträchtlich sind, ist die Wahl einer geeigneten Agarose-sorte nicht beliebig.

Zum Einen sollte das Gel natürlich ausreichend fest sein, was bei manchen Präparaten erst bei einer Konzentration von 1,5 - 2 % zu erreichen ist ⁴⁾.

Zum Anderen sinkt die Zuverlässigkeit der Methode mit steigendem elektro-endosmotischem Wasserfluß. Dieser ist leider nicht völlig zu vermeiden und kann unter anderem bis zur Auswaschung der Antikörper aus dem Gel führen. Eine geringfügige Wasserverschiebung wird allerdings weitgehend durch die langsame elektrophoretische Wanderung der Antikörper in Gegenrichtung ausgeglichen ³³⁾.

Agarose ist die Fraktion des Agars (ein aus bestimmten

Algenarten gewonnenes, sehr heterogenes Polysaccharid-gemisch), die am wenigsten ladungstragende Substituenten (meist Sulphatgruppen) enthält. Allerdings scheinen völlig neutrale Agarosemoleküle, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen im Agar enthalten zu sein, so daß in allen handelsüblichen Präparaten Sulphat- und Hydrogen-carbonatgruppen gebunden sind.

Schließlich unterscheiden sich die Agarosepräparate in der Erstarrungstemperatur, was wohl zumindest zum Teil, auf den Gehalt an 6-O-methyl-D-galactopyranose zurückzuführen ist ²⁶⁾. Das Gel sollte auch nach der Erstarrung möglichst wenig gelöste Polysaccharide enthalten, da diese als geladene Partikel die Elektrophorese stören.

Wir verwendeten ausschließlich Litex- und Servaagarose. Je nach dem untersuchten Gerinnungsfaktor bereiteten wir Lösungen von 0,8 - 1,0 % (s. Tab. 6).

2.2.3.1.2 Wahl des Puffers

Bei unseren Simultanbestimmungen (Antithrombin III + Faktor-VIII-assoziiertes Antigen sowie α_1 -Antitrypsin + α_2 -Makroglobulin) verwendeten wir Barbitalpuffer der Ionenstärke $\mu = 0,02$ mit einem pH von 8,6 ⁴⁾ für Agarosegel und Elektrophoresekammer (s. Seite 9).

Lediglich für Faktor-XIII-Bestimmungen erwies sich eine höhere Ionenstärke $\mu = 0,075$ als vorteilhafter. Einen ähnlichen Puffer beschreibt schon Johannson ²⁶⁾, allerdings setzten wir statt Laktat 0,013 M EDTA zu, da wir mit Laktat unsaubere Präzipitate erhalten hatten. Auch diesen Puffer gebrauchten wir gleichermaßen für Gel und Kammer.

Grundsätzlich wechselten wir den Puffer nach jeder Elektrophorese und spülten vorher die Puffertröge mehrmals sorgfältig mit aqua dest., um Pufferverunreinigungen z.B. durch Proteine zu vermeiden.

2.2.3.1.3 Herstellung gebrauchsfertiger Gelportionen

Agarosepulver wird in einem Erlenmeyerkolben gewogen und mit dem zugehörigen Puffer im Verhältnis 1:100 bzw. 1:125 (1 bzw. 0,8 %iges Agarosegel) unter dauerndem Rühren im kochenden Wasserbad erhitzt. Ist die Agarose völlig gelöst, d.h. die Lösung klar und schlierenfrei, so wird sie in Reagenzgläser zu Portionen von jeweils 16 ml abgefüllt.

Wir lagern die fertigen Gelportionen im Kühlschrank bei $+4 - +6^{\circ}\text{C}$ ⁴⁾ maximal zwei bis drei Monate.

Erläuterung zur Faktor-XIII-Bestimmung: Wie schon im Abschnitt über die Pufferwahl erwähnt, stellte die Immunelektrophorese von Faktor XIII für uns ein besonderes technisches Problem dar. Mit 1 %igem Agarosegel (wie für die Simultanbestimmungen verwendet) wurden die Faktor-XIII-Präzipitate zu kurz. Wir versuchten also durch größere Gelporen die Peaks zu verlängern. Da die Porengröße des Gelgerüsts der Gelkonzentration umgekehrt proportional ist, senkten wir die Konzentration auf 0,8 % und erhielten schließlich ausreichend lange Präzipitate. Allerdings ist nun höhere Vorsicht beim Gießen der Platten geboten, weil mit der Konzentration auch die Festigkeit des Gels geringer geworden ist.

2.2.3.2 Gießen antikörperhaltiger Agaroseplatten

2.2.3.2.1 Antiseren

Nach einer Empfehlung von Laurell wählt man die geringste Antiserummenge, die noch deutlich gefärbte Peaks ergibt. Schwächere Präzipitate sind grundsätzlich kräftigen vorzuziehen, da sie meist klarer abgegrenzt sind und letztere häufiger Unregelmäßigkeiten bilden. Dieser Grundsatz ist bei Proteinen mit einem Molekulargewicht über 200 000 ganz besonders wichtig; in unserem Falle also Faktor XIII (MG = 340 000), α_2 -Makroglobulin (MG = 820 000) und vor allem Faktor-VIII-assoziiertes Antigen (MG unbekannt - wahrscheinlich über 2 000 000). Zudem

nimmt mit sinkender Antiserummenge die Steigung der Eichkurve und damit die Ablesegenauigkeit zu.

Es darf allerdings nicht verschwiegen werden, daß wir die Antiserummengen je nach Agarosesorte und -charge immer wieder variieren mußten. Wir bitten daher, die in Tabelle 6 aufgeführten Zahlen als Richtwerte zu verstehen, deren Änderung im Einzelfall durchaus nötig sein kann.

Tabelle 6

Technische Daten zur Immunelektrophorese nach Laurell für einige hamatologische Parameter

	F XIII	F VIII u. AT III* (Simultanbest.)	a ₂ -M u. a ₁ -Atr.* (Simultanbest.)	
Agarose:				
a) Konzentration	0,8%	1%	1%	
b) Firmen	Serva und Litex (Denmark) für alle Bestimmungen			
Puffer:				
a) Ionenstärke	Barbital μ = 0,075	Barbital μ = 0,02	Barbital μ = 0,02	
b) pH-Wert	8,6 + SDTA 0,01M	8,6	8,6	
Antiserum:				
a) Konzentration	0,125%	0,25%	1,25%	1,88%
b) Firmen	Behring (Untereinheit A)	Behring Nyegaard, Behring	Behring-Werke	
Verdünnung der Plasmaproben				
	1:1	1:2	1:16	
Eichkurve:				
a) Verdünnungen	1:1 - 1:16	1:1 - 1:32	1:1 - 1:128	
b) Standards	St. Human Pl. (Protein Standard Plasma Behring-Werke)	Zitrat-Pool St. Human Pl.	Zitrat-Pool St. Human Pl.	
Meßbereich:				
	100% - 5,25%	200% - 6,25% 1 - 30 mg%	800% - 12,5% 2 - 200 mg% 1,5 - 150 mg%	
Ausgangssp. U				
	150 V	120 V	150 V	
Feldstärke E				
	2 - 3 $\frac{V}{cm}$ für alle Bestimmungen			
Zeit				
	16 - 20 h	14 - 20 h	8 - 12 h	
Kühlung				
	15 - 20 °Celsius für alle Bestimmungen			

2.2.3.2.2 Kleine Platten 9 x 11 cm

Wir verflüssigen ein Portionsröhrchen (ca. 16 ml/Platte) der entsprechenden Agarosesorte im kochenden Wasserbad bis das Gel seine milchige Trübung völlig verloren hat und wasserklar wird. Durch vorsichtiges Schütteln und Betrachten des schräggehaltenen Röhrchens gegen das Licht schließen wir aus, daß die Lösung noch durchsichtige Klumpen enthält, die später die Platte verderben würden. Darauf lassen wir das Gel in einem, auf 56 °C temperierten Wasserbad abkühlen, wobei der Agarosespiegel nicht über den Wasserspiegel reichen darf ⁵⁶⁾.

Inzwischen wurde ein Reagenzglas mit der nötigen Menge des entsprechenden Antiserums (oder der zwei Antisera bei Simultanbestimmung) in einem zweiten Wasserbad auf 37 °C temperiert. Nach einigen Minuten kann man das nun auf 56 °C abgekühlte Gel zuschütten, verschließt dann das Reagenzglas mit dem Daumen und wendet es zur Durchmischung etwa drei Mal schnell aber vorsichtig, um möglichst keine Luftblasen entstehen zu lassen.

Dann gießt man von der Seite her auf die Glasplatte, die auf dem Horizontaltisch mit dem Föhn leicht vorgewärmt wurde, soviel Gel, daß sie ganz und gleichmäßig bedeckt ist; dabei werden meist 1 - 3 ml Gel überbleiben. Ein heizbarer Horizontaltisch erspart natürlich das etwas umständliche Vorwärmen der Glasplatten mit dem Föhn.

Die Gelplatte kühlt nun etwa 5 - 10 Minuten ab, wobei das Gel erstarrt und wieder seine ursprüngliche milchige Trübung annimmt.

Erläuterungen:

Wir halten es im Gegensatz zu Weeke ⁵⁷⁾ für sinnvoll, das Agarosegel zum Antiserum (kleinere Menge!) zuzugeben und nicht umgekehrt, weil durch die fortschreitende Verdünnung schnell eine bessere Durchmischung erreicht wird. So verstreichen von der Entnahme der Agarose aus dem Wasserbad nur wenige Sekunden, was eine zwischenzeitliche Erstarrung des Gels fast unmöglich macht.

Das Antiserum im Reagenzglas wärmen wir bei nur 37 °C vor, um die Zeit der unphysiologischen Hitzebelastung möglichst kurz zu halten. Das gleiche Wasserbad verwenden wir übrigens auch, um unsere Plasmaproben vor dem Auftragen vorzuwärmen, insbesondere aber, um die tiefgefrorenen Plasmen aufzutauen, weil sonst Kryopräzipitate das Ergebnis verfälschen könnten.

Eine Beschichtung der Glasplatten mit einem feinen Agarosefilm vor dem Gießen ist nur dann nötig, wenn die Gelplatten nach der Elektrophorese über Nacht oder länger gewaschen werden müssen ⁵⁶⁾ (Dies ist z.B. bei der gekreuzten Radioimmunelektrophorese der Fall). Preßt man das Gel aber unmittelbar nach der Elektrophorese, so sollte man auf eine Beschichtung verzichten, da sie zwar die Haftung des Gels auf der Glasplatte verbessert, ein störender Einfluß auf die Präzipitation aber nicht auszuschließen ist.

Wir erhalten beim freien Gießen unserer Gelplatten eine Geldicke von etwa 1,5 mm ⁵⁶⁾, die nach Weeke beim freien Gießen wesentlich leichter in gleichmäßiger Schichtdicke herzustellen ist als dünnere Beschichtungen ^{55) 56)}. Laurell empfiehlt dagegen eine Gelschicht von 1 mm, da er bei größeren Dicken häufiger unregelmäßige Präzipitationen sah ²²⁾. Wir verwenden allerdings wesentlich niedrigere Spannungen und längere Laufzeiten und hatten diesbezüglich auch bei schwacher Kühlung noch nie Schwierigkeiten.

2.2.3.2.3 Große Platten 20,5 x 11 cm

Da beim freien Gießen der großen Platten die Gleichmäßigkeit der Schichtdicke sehr unsicher wird, gießen wir unsere großen Platten grundsätzlich mit U-Rahmen von 1,5 mm Dicke, um weiter genau analog wie bei den kleinen Platten verfahren zu können. Der U-Rahmen hält zwei Glasplatten in konstantem Abstand exakt parallel, der Preßdruck der Bulldogklemmen dichtet den schlitzförmigen Trog ab.

Für eine Platte benötigen wir zwei Portionsröhrchen zu je 16 ml Gel. Sie werden, wie oben beschrieben, erhitzt und temperiert. Als Gefäße für die Antiseren und zur Mischung

mit der Agarose nehmen wir Bechergläser oder Erlenmeyerkolben von 30 - 50 ml. Die ursprünglich verwendeten 30 ml-Pipetten erwiesen sich als zu unhandlich. Deshalb füllen wir die Gußform jetzt direkt mit dem Mischgefäß. Dabei wird zwar manchmal etwas Agarose verschüttet, was aber ohne Bedeutung ist, weil zwei Portionsröhrchen ohnehin reichlich bemessen sind.

Wie die kleinen Platten, so sollte man auch die Gußform vor dem Gießen vorwärmen. Dadurch verzögert man die Erstarrung so, daß Luftblasen, die sich relativ häufig bilden, im noch flüssigen Gel langsam nach oben zum Einfüllschlitz entweichen können. Bleiben die Luftblasen im Gel stehen, so kann man sie leicht mit einer feinen Nadel nach oben drängen, wenn das Gel noch nicht erstarrt ist. Die Außenseiten der Gelplatten reinigt man von eventuell übergelaufenem Gel, solange dies noch flüssig ist.

Ist das Gel schließlich blasenfrei, so stellt man die Form senkrecht in den Kühlschrank, wo es in wenigen Minuten unter zunehmender Eintrübung erstarrt.

Man legt nun die Gußform waagrecht auf den Tisch und hebt mit der Schneidklinge die obere Glasplatte vorsichtig von einer Seite her ab. Dies muß langsam geschehen, damit sich das Gel nicht von der unteren Glasplatte abheben kann. Dann wird der U-Rahmen scharf mit der Schneidklinge vom Gel getrennt und kann nun ebenfalls leicht abgehoben werden.

2.2.3.2.4 Haltbarkeit fertiger Gelplatten

Ist es nicht möglich, die gegossenen Gelplatten sofort zu verwenden, so sollte man große Platten noch in der Gußform lassen, wo sie einige Stunden haltbar sind.

Kleine oder bereits freigelegte große Platten bewahrt man in fertig hergerichteten Elektrophoresekammer (oder einer anderen feuchten Kammer) auf. Die Kühlung darf man dabei allerdings nicht einschalten, weil sich sonst Kondenswasser auf der Geloberfläche absetzt.

2.2.3.2.5 Lochen der Platten

Mit Hilfe der Stanzschablone und der Stanzkanülen mit Teleskop-Ansaugvorrichtung ist es einfach, die Platten schnell und präzise zu lochen. Da 4 mm- Löcher (Fassungsvermögen = 10 μ l) keine besseren Ergebnisse brachten, verwendeten wir für alle Bestimmungen Stanzkanülen mit 2,5 mm Durchmesser (5 μ l); bei noch geringeren Auftragsvolumina leidet allerdings die Reproduzierbarkeit ⁵⁶⁾.

Zum Schutz vor dem Austrocknen bewahrt man gelochte Platten vorübergehend in der geschlossenen, betriebsbereiten Elektrophoresekammer auf. Schaltet man dabei schon die Kühlung ein, dann füllen sich die Auftragslöcher sehr schnell mit Kondenswasser, und die Plasmaprobe läuft beim Auftragen über. Hat sich in den Auftragslöchern Kondenswasser angesammelt, muß man sie vor dem Auftragen mit einer Doppelkonstriktionspipette oder einem schmalen Filterpapierstreifen sorgfältig leersaugen, da jedes Überlaufen zum Konfluieren der Peaks führt (s. Abb. 1).

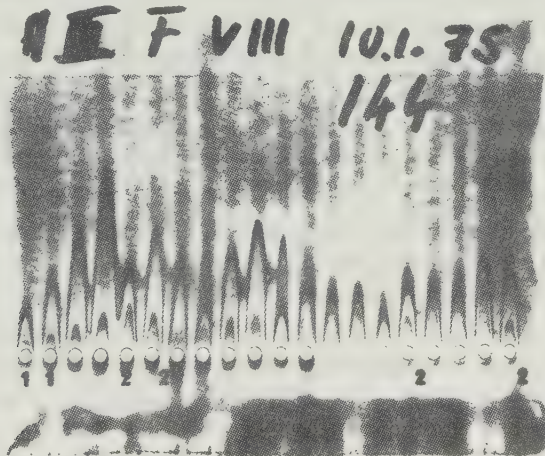


Abb. 1 : Simultanbestimmung AT-III + F-VIII. Über 1 gezackte innere Präzipitate (F VIII) durch Verstopfung der Gelporen wegen der zu hohen Antigenkonzentration einer stark verdunsteten Probe (unzureichende Kühlung!). Über 2 schleierartige Verbindungen zwischen konfluerten Präzipitaten (s. oben).

2.2.3.3 Durchführung der Elektrophorese

2.2.3.3.1 Eichkurve

Da die Gelplatten weder mit hinreichender Präzision gleich gegossen werden können, noch völlig identische Bedingungen während verschiedener Immunelektrophoresen zu erreichen sind, muß jede Platte eine eigene Eichkurve erhalten. Sie besteht bei uns aus 5 - 7 Verdünnungen des Referenzplasmas, die einer Verdünnungsreihe mit fortlaufenden 1 : 2 -Verdünnungen entsprechen (z.B.: 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% - s. Tab. 6). Die Eichverdünnungen werden in ansteigenden Konzentrationen vom linken Rand der Platte her aufgetragen und zur Kontrolle die 100 %-Verdünnung nochmals am rechten Plattenrand (s. auch Fehlerkontrolle Tab. 7). Unterscheiden sich die beiden 100 %-Werte des Referenzserums um mehr als 10 % (bei Faktor XIII 15 %) wird die Platte verworfen.

Diese Kontrollverdünnung erwies sich als notwendig, weil wir bei fast allen unseren Platten einen geringen systematischen Fehler beobachteten. Der rechte Wert war nämlich in der Regel höher als der linke. Diese Erscheinung veranlaßte vermutlich Laurell zu der Empfehlung, die Eichkurvenverdünnungen in die mittleren Löcher der Auftragsreihe einzufüllen³³⁾. Wir haben uns dennoch zu dem beschriebenen Verfahren entschlossen, um den maximalen Fehler quantifizieren zu können (von Versuchsplatten wissen wir, daß der Fehler zwischen zwei Peaks um so größer ist, je weiter sie auf der Platte voneinander entfernt sind). Mögliche Ursachen des bislang noch ungeklärten Fehlerproblems werden wir später noch diskutieren (s. Abschnitt 2.2.4).

Unsere 1 : 2-Verdünnungsreihe lieferte den für unsere Untersuchungen nötigen Meßbereich bei guter Genauigkeit. Für spezielle Fragestellungen mit relativ gut bekannten Erwartungswerten erreicht man durch näher zusammenliegende Eichverdünnungen eine noch höhere Meßgenauigkeit. So empfiehlt Weeke z.B., eine 75 %-Verdünnung mit aufzutragen⁵⁶⁾, die durch Mischen gleicher Mengen der 100 %- und 50 %-Verdünnung schnell herzustellen wäre.

Als Standard verwendeten wir vor allem einen eigenen Zitratplasmapool von 25 Normalpersonen. Versuche mit kommerziellen Referenzplasmen waren wegen der erheblichen Schwankungen unbefriedigend. Deshalb und weil unser Pool-Plasma auf die gleiche Weise vorbehandelt ist wie die zu bestimmenden Proben, werden wir uns in Zukunft nur noch auf unseren "hauseigenen" Zitratpool verlassen.

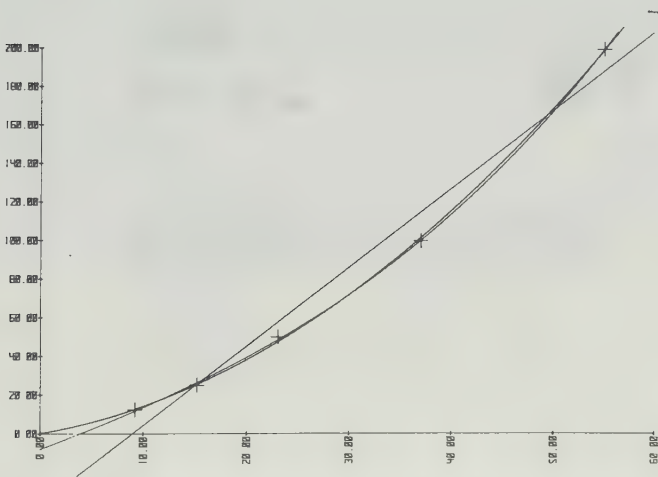


Abb. 2 : Die Analyse einer Eichkurve (Faktor XIII) zeigte, daß sie einer Funktion 3. Grades am nächsten kommt (auf der Abbildung die Kurve, die durch den Nullpunkt geht). Die beiden anderen Graphen sind Funktionen ersten und zweiten Grades. Auf der Ordinate sind die Meßwerte in Prozent des Normalwertes aufgetragen, auf der Abszisse die Peakhöhen in mm.

Aus den Standardverdünnungen des Referenzplasmas wird die Eichkurve gezeichnet, die für jede vorgegebene Präzipitathöhe leicht die zugehörige Antigenkonzentration finden läßt. Wir geben alle gefundenen Werte in Prozent der Norm an.

Prinzipiell wäre zwar der planimetrische Vergleich der Flächen unter den Präzipitaten die exakteste Methode, doch ist dies für die Routinediagnostik zu aufwendig. Wenn das Erscheinungsbild der Peaks einheitlich ist, was nicht immer der Fall zu sein braucht (s. Abb. 3), so erfaßt die Präzipitathöhe mit guter Näherung die Antigenkonzentration der Probe.

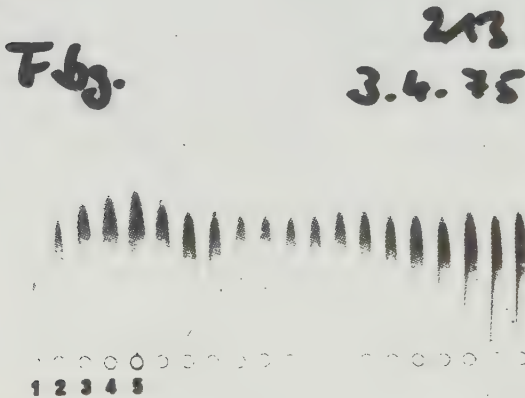


Abb. 3 : Immunelektrophoretische Bestimmung von Fibrinogen. Diese Platte ist nicht durch Messung der Präzipitathöhen auswertbar, weil das Erscheinungsbild der Peaks nicht, wie oben gefordert einheitlich ist. Besonders die Eichverdünnungen (Nummer 1 - 5) zeigen, daß mit steigender Antigenkonzentration die Präzipitate statt länger dicker werden.

Um auch die Fehler von Platte zu Platte und von Tag zu Tag erfassen zu können, ließen wir später zusätzlich zwei Verdünnungen (100% und 50%) eines Poolplasmas aus Blutkonserven an willkürlichen Auftragsstellen mitlaufen, um so eine Qualitätskontrolle einzuführen. Da sich dieser Aufwand für kleine Platten kaum lohnt, führen wir gezielte

Untersuchungen jetzt nur noch mit großen Platten durch.
(zur Qualitätskontrolle vergl. Tab. 8 Abschnitt 2.2.6)

2.2.3.3.2 Verdünnen der Plasmaproben

Unsere Plasmen lagern bei -40°C in der Tiefkühltruhe und halten so mindestens ein halbes Jahr. Im Wasserbad von 37°C werden sie aufgetaut und temperiert. Da jedes Auftauen die Haltbarkeit beeinträchtigt, ist es empfehlenswert, beim Auftauen auch wirklich alle anfallenden Bestimmungen auf einmal vorzunehmen statt mehrmals aufzutauen.

Wir verdünnen alle Proben mit Owrens Veronalpuffer (pH = 8,6). Wie schon erwähnt sind zarte Peaks kräftigen vorzuziehen (vergl. S. 16 f.). Dies wird nicht nur durch die geringstmögliche Antiserummenge erreicht sondern auch durch ausreichendes Verdünnen der Plasmaproben (besonders wichtig bei Molekulargewicht des Antigens über 200 000). Dem Verdünnen sind allerdings durch die sinkende Peakhöhe und die abnehmende Deutlichkeit der Präzipitate Grenzen gesetzt.

Die verschiedenen Autoren geben an, daß zwischen 1 und 5 cm Präzipitathöhe und Antigenmenge am engsten korrelieren, die Ergebnisse also am besten reproduzierbar sind; Laurell nennt als ideale Peakhöhe für quantitative Arbeiten den Bereich von 2 - 3 cm (10) 55) 56).

Osmolalität und Ionenstärke von Proben und Puffer sollen nach Laurell möglichst gut übereinstimmen, was leider nur sehr bedingt möglich ist. Wir stellten jedoch fest, daß das System nicht sehr empfindlich reagiert und erhielten lediglich mit konzentriertem Urin unbefriedigende Ergebnisse.

2.2.3.3.3 Vorbereitung der Elektrophoresekammer mit den Gelplatten

Die Elektrophoresekammern müssen genau waagrecht stehen, da man sonst schiefe Präzipitate erhält (56). Wir füllen die Puffertröge mit ca. 1 l Fassungsvermögen bis auf etwa 1 cm unter den Rand, um durch eine reichliche Puffermenge auch für unsere Langzeitelektrophoresen die nötige Pufferkapazität

zu erhalten. Die Pufferflüssigkeit in den beiden Trögen wird für einige Minuten mit dem Niveauregler nivelliert, um unnötige Strömungen im Gel zu vermeiden.

Wir schneiden Filterpapier von 1 mm Dicke in Rechtecke, so daß eine Seite genau der Gelbreite (nicht der Plattenbreite !) entspricht und das Filterpapier andererseits tief in den Puffertrog eintauchen kann. Ist das Rechteck zu breit und reicht an den Seiten über das Gel hinaus, so neigen sich die Präzipitate von den Rändern weg nach innen; man erhält aber auch schiefe Präzipitate, wenn sich die Filterpapierstreifen benachbarter Platten berühren (s. Abb. 4).

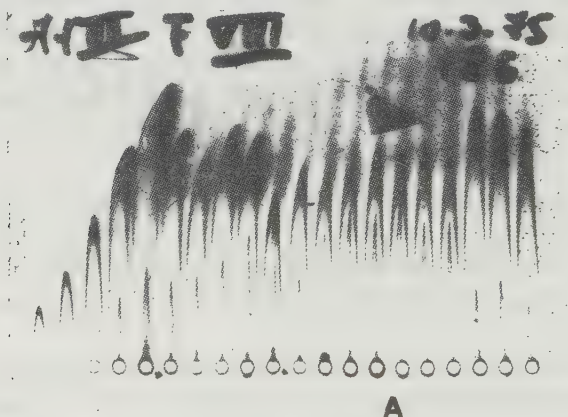


Abb. 4 : Simultanbestimmung AT III + F VIII (innerer Peak)

Die Platte verdeutlicht mehrere technische Fehler:

1. Links sind die Peaks nach innen geneigt, da hier das Filterpapier den Gelrand überragte. Dadurch trat Puffer nicht nur in Stromrichtung sondern auch von links ins Gel ein.
2. Der dunkle Fleck über A ist ein Gelklumpen, der sich beim Erhitzen des Gels nicht verflüssigt hatte (vergl. S. 18).
3. Die schneeflockenartigen Punkte sind Partikel ungelösten Farbstoffes (ungenügende Entfärbung der Platte !)

Man stellt das Filterpapier in die Puffertröge, wo es sich mit Puffer vollsaugt. Die gut durchfeuchteten Filterpapierstücke werden nun auf beiden Längsseiten so auf die Agaroseplatten gelegt, daß sie jeweils einen etwa 1 cm breiten Gelstreifen bedecken. Dann drücken wir sie vorsichtig an, weil bei unzureichendem Kontakt statt Präzipitaten Diffusionsringe entstehen können ⁴⁾.

2.2.3.3.4 Auftragen der Proben und Ablauf der Elektrophorese

Um zusätzliche Fehler zu vermeiden, verwenden wir zum Auftragen von Proben und Eichkurve jeweils die gleiche Pipette. Weeke und Laurell fordern, daß das Auftragen aller Proben einschließlich Eichkurve nicht mehr als fünf bzw. zehn Minuten in Anspruch nehmen soll ^{33) 56)}; dadurch versuchen sie zu verhindern, daß die zuletzt aufgetragenen Peaks zu hoch, die bereits (in alle Richtungen !) vordiffundierten ersten Peaks zu nieder werden. Wir legen nach einem Vorschlag von Weeke und Becker eine Vorspannung von 80 V an, die eine ungerichtete Vordiffusion verhindern soll ^{4) 56)}, beeilen uns aber dennoch mit dem Auftragen, ohne jedoch die nötige Sorgfalt außer Acht zu lassen. Wenn wir mit mehreren Kammern arbeiten, lassen wir jeweils die erste Kammer schon laufen, während wir in der zweiten noch auftragen.

Um den Auftragsfehler möglichst gering zu halten, verwenden wir zum Auftragen keine Doppelkonstriktionspipetten, sondern Präzisions-Mikroliterspritzen ^{55) 56)}.

Wir tragen die Probe - sie soll etwa 80 - 90 % des Fassungsvermögens der Auftragsstelle entsprechen - am Rande des Stanzloches auf und vermeiden dabei sorgfältig das Entstehen von Luftblasen, die die Oberflächenspannung vermindern können und dann zur Ausbreitung von Antigen rund um die Auftragsstelle führen ³³⁾. Man darf in die Auftragsstellen weder zu viel noch zu wenig Plasma einfüllen. Im ersten Fall erhält man atypische oder gar völlig konfluente Peaks (vergl. S. 21), wenn man alle Auftragslöcher überfüllt hat. Im zweiten Fall oder wenn das Stanzloch zu groß geraten ist, steigen die Seitenlinien nicht, wie normal, tangential

vom Stanzloch auf sondern man erhält zu schmale und in Folge dessen zu hohe Präzipitate ³³⁾.

Nach dem Auftragen der Proben schalten wir von der Vorspannung auf die Elektrophoresespannung um und notieren Spannung, Stromstärke, Feldstärke und Auftragszeit auf dem Dokumentationsblatt (s. Abschnitt 2.2.3.4.5). Darauf wird die Kühlung eingeschaltet (15 - 20 °C) und der Deckel der Kammer so verschoben, daß noch Luftspalte frei bleiben. Nun kann die Elektrophorese - z.B. über Nacht - sich selbst überlassen werden (Laufzeiten s. Tab. 6).

Erläuterung zur Laufzeit: Wir entschieden uns nach mehreren Versuchen mit Schnellelektrophoresen grundsätzlich für die Langzeitelektrophorese über Nacht, weil sie weniger stör anfällig ist, ein Drittel weniger Antiserum braucht als die Schnellelektrophorese mit hohen Spannungen und besonders bei hochmolekularen Proteinen schärfere und stumpfere (also genauer ablesbare) Präzipitate liefert ^{33) 55) 56)}. Bei schwach präzipitierenden Proteinen - besonders Faktor XIII und Faktor-VIII-assoziiertem Antigen - erwies es sich als günstig, nach dem Abschalten der Spannung die Anordnung unverändert stehen zu lassen. Nach Erreichen der endgültigen Länge haben die Präzipitate noch lange nicht die optimale Antikörpermenge gebunden, so daß noch Antikörper aus der Umgebung in das Präzipitat hineindiffundieren können (vergl. S. 13). Den gleichen Effekt erreicht man, wenn man das Gel über Nacht in Kochsalz wäscht, was gleichzeitig noch den Hintergrund entfärbt, für Routinebestimmungen aber zu aufwendig ist und zudem das Gel von der Platte ablösen kann. Da die genannten Maßnahmen schwache Präzipitate oft noch erheblich verstärken können, schalteten wir die Spannung oft schon am Morgen ab und ließen die Anordnung dann bis zum Nachmittag stehen.

2.2.3.3.5 Kühlung

Wasser von 15 - 20 °C durchfließt die Kühlschlange der Trägerplatte und führt so die Widerstandswärme des Gels ab. Ursprünglich schlossen wir den Kühltisch an die Wasser-

leitung des Hauses an, beschafften uns aber auf Grund leidvoller Erfahrungen mit zwei größeren Überschwemmungen, die jeweils mehrere Labors unter uns verwüsteten, ein Kühlaggregat mit nur noch fünf Liter Kühlwasser. Zum Schutz vor Algen und Mikroorganismen setzen wir 1 g/l NaNO_3 zu ⁵⁶⁾.

Bedeutung der Kühlung: Die Kühlung beeinflusst die Höhe der Präzipitate mittelbar über den Wassergehalt bzw. Quellungszustand des Gels, da die durchschnittliche Porengröße der Konzentration des Gels indirekt, dem Wassergehalt also direkt proportional ist. Zudem beeinflusst die Kühlung aber auch die Präzipitation bzw. Aggregation, weil diese als chemische Reaktionen naturgemäß temperaturabhängig sind. Starke Kühlung ergibt hohe, etwas verwaschene Präzipitate auf Grund schlechter Aggregation, während schwache Kühlung zu schnellerer Aggregation und in Folge dessen zu niedrigeren und schärferen Präzipitaten führt. Die Extreme zu starker und zu schwacher Kühlung sind Eintrocknen des Gels und Kondensation von Wassertropfen auf der zu kalten Geloberfläche. Ursprünglich dachten wir bei dem ungeklärten systematischen Fehler (vergl. S. 22 und Abschnitt 2.2.4) mit an ein Kühlungsproblem, was wir inzwischen allerdings für unwahrscheinlich halten. Da die Kühlschlange (8 mm breit) durch schlecht wärmeleitende Plexiglas-Trennwände unterteilt ist, werden nur etwa 65 % des Kühltisches, abzüglich der Seitenränder direkt von der Kühlschlange gekühlt. Daraus folgt nach unseren Überlegungen eine diskontinuierliche Temperaturverteilung im Kühltisch, die durch einen guten Wärmeleiter, z.B. eine in den Kühltisch eingegossene Kupferplatte, in eine homogene Temperaturverteilung umgewandelt werden könnte.

2.2.3.4 Weiterbehandlung der Platten

2.2.3.4.1 Pressen

Ziel ist, alle nicht präzipitierten Proteine möglichst vollständig aus dem Gel zu entfernen und die Platten zur Färbung vorzubereiten. Es lassen sich hierzu keine generellen Richtlinien angeben, da der Umfang der erforderlichen Maßnahmen weitgehend vom jeweiligen Antigen-Antikörper-System abhängt⁵⁶⁾. Das beschriebene Verfahren gilt also strenggenommen nur für die von uns bestimmten Proteine.

Nach Abschalten der Spannungsquelle heben wir die Filterpapierstreifen von den Gelplatten ab. Die Platten legen wir mit der Glasseite nach unten auf ein ausgebreitetes Papierhandtuch, füllen die Auftragslöcher mit physiologischer Kochsalzlösung und bedecken jede Gelplatte so mit einem passenden Stück Filterpapier, daß keine Luftblasen zwischen Gel und Filterpapier eingeschlossen werden; diese könnten zum Einreißen des Gels führen. Wir bedecken die Gelplatten dann mit einer etwa zwei Zentimeter dicken Zelloffschicht und beschweren diese mit dem umgedrehten Horizontaltisch, auf den wir zwei volle Einliterflaschen stellen. Die Fläche des Horizontaltisches reicht gerade für zwei große (20,5 x 11 cm) oder vier kleine (9 x 11 cm) Platten. Der Preßdruck entspricht dem Vorschlag von Weeke, der 10 g/cm² (also 4 kg für 400 cm²) empfiehlt⁵⁶⁾. Bei einer geringeren Anzahl von Platten ist der Preßdruck entsprechend zu reduzieren.

Nach einer Preßzeit von 15 Minuten spülen wir jede Platte vorsichtig mit einem dünnen Strahl destillierten Wassers ca. 30 Sekunden und pressen mit neuem Filterpapier nochmals für 15 Minuten.

Färbt sich bei höheren Antigen- oder Antikörperkonzentrationen der Hintergrund stärker an, so kann man zusätzlich vor dem Pressen die Platte 30 Minuten lang in physiologischer Kochsalzlösung vorwaschen. Längere Waschzeiten z.B. über Nacht wie Laurell sie beschreibt, waren

bei uns nie nötig. Kommt man ohne sie nicht aus, sollte man die Glasplatte vor dem Gießen mit einer möglichst dünnen Gelschicht beschichten, damit sich das Gel beim Waschen nicht von der Platte löst ³³⁾ 56).

2.2.3.4.2 Trocknen

Nach dem zweiten Pressen trocknen wir unsere Platten im Brutschrank oder mit einem Föhn. Da wir die Gelplatten grundsätzlich pressen, ist es nicht nötig sie beim Trocknen mit Filterpapier abzudecken, wie beim Lufttrocknen über Nacht ohne vorheriges Pressen ³³⁾.

2.2.3.4.3 Färben

Wir verwenden als Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R, das etwa die dreifache Farbintensität von Amidoschwarz hat. Die absolut trockenen Platten werden etwa fünf bis zehn Minuten in die Färbelösung gehängt und jeweils ca. 15 Minuten im ersten und zweiten Entfärbebad entfärbt. Danach lassen wir sie (auf Zellstoff) stehend an der Luft trocknen.

Wegen der starken Verdunstung muß das Lösungsmittel im Färbegrad regelmäßig nachgefüllt werden. Die Entfärbelösung kann man mit Aktivkohle regenerieren ⁴⁾; wir fanden es aber einfacher die Entfärbebäder zu wechseln.

Man sollte die Platten nicht "um jeden Preis" entfärben wollen, da man bei schwachen Präzipitaten - z.B. Faktor XIII und Faktor-VIII-assoziiertem Antigen - schon wieder die Peaks herauswäscht, ehe man einen völlig farblosen Hintergrund erhält. Wir nehmen deshalb in diesen Fällen lieber einen zartvioletten Hintergrund in Kauf. Den Mittelweg zwischen maximaler Präzipitatisfärbung und der geringsten erreichbaren Hintergrundfärbung muß man empirisch finden.

Zum Schluß noch eine Warnung: Coomassie Brilliant Blue R ist ein unglaublich intensiver Farbstoff und kann von Händen und Kleidung kaum noch entfernt werden. Wir empfehlen deshalb dringend, beim Hantieren mit der Färbelösung grundsätzlich Gummihandschuhe zu verwenden.

2.2.3.4.4 Auswertung

Alle Platten werden sofort nach dem Färben mit der laufenden Nummer des Dokumentationsbogens, dem Tagesdatum und der Art der Bestimmung beschriftet:

Wir werten unsere Platten unter einer Lupe (Firma Hensoldt/Wetzlar) mit dem Stechzirkel aus, was nach unserer Erfahrung genauer ist als Auflegen auf Millimeterpapier. Die Präzipitathöhen messen wir von der Oberkante der Auftragslöcher aus. Das ergibt nach eigenen Vergleichsreihen eine geringere Interbeobachtervarianz als die Messung von der Mitte des Auftragsloches, wie Laurell sie empfiehlt ³³).

Nur wenn die Peaks abgesehen von der Höhe morphologischen der Eichkurve gleichen, können sie nach dieser Eichkurve quantifiziert werden. Auffallende Unterschiede der Abgrenzbarkeit, Dichte, Breite, Proteinverteilung, Konvergenz und der Spitze der Präzipitate weisen auf molekulare Inhomogenität des bestimmten Proteins oder ein nicht hinreichend spezifisches Antiserum hin.

Für jeden mit dem Stechzirkel abgegriffenen Peak wird aus der Eichkurve der zugehörige Wert in Prozent der Norm abgelesen, bei uns im allgemeinen auf zwei Prozent genau.

Bei den Simultanbestimmungen sind die Peaks der verschiedenen Proteine an morphologischen Eigenschaften leicht zu erkennen auch wenn sich die Höhen der Peaks nicht typisch unterscheiden.

2.2.3.4.5 Dokumentation

Zu jeder unserer Platten legen wir ein Dokumentationsblatt mit fortlaufender Nummerierung an. Es enthält das Bestimmungsdatum, alle technischen Daten, die Namen der Patienten, die Daten der Blutabnahmen, die aufgetragenen Verdünnungen und die zugehörigen Eichkurven. Alle Dokumentationsblätter sind in fortlaufender Nummerierung abgeheftet.

Die zugehörigen Platten werden in Briefumschlägen, die mit Plattennummer, Tagesdatum und Art der Bestimmung beschriftet sind, gemäß ihrer Nummerierung in Karteikästen aufbewahrt.

2.2.4 Technische Probleme

Wie schon erwähnt, beobachteten wir bei fast allen unseren Platten einen gewissen systematischen Fehler (vergl. S. 22). Die zuletzt aufgetragenen, in der Regel rechten Peaks waren zumeist etwas höher als die ersten. Wir dachten an verschiedene Ursachen, die wir im Folgenden diskutieren werden.

2.2.4.1 Ungleiche Geldicke

Bei den frei gegossenen Platten suchten wir einen Fehler in der Eichung des Gießtisches zu entdecken, fanden aber den gleichen Fehler auch bei den mit U-Rahmen gegossenen Platten.

Wir maßen darauf mit der Schublehre die Dicken unserer U-Rahmen nach und fanden bei dem einen Unterschiede unter 5 %, bei dem anderen immerhin Fehler bis zu 10 %. Laurell berichtet sogar von Fehlern über 10 %, so daß es sicher empfehlenswert ist, neue Rahmen vor Gebrauch erst einmal durchzumessen. Die Dickenunterschiede waren allerdings nicht systematisch verteilt, so daß die dünnsten Stellen eher schlechte Dichtung des Rahmens als größere Unebenheiten des Gels bewirken konnten. Trotzdem verwendeten wir den Rahmen mit über 5 % Fehler nicht mehr und drehten unseren U-Rahmen beim Gießen der nächsten Platte jeweils um, was aber die Richtung des systematischen Fehlers nicht änderte.

2.2.4.2 Randphänomene

Da wir die erste 100 %-Verdünnung als Teil der Eichkurve drei oder vier Peaks vom linken Rand entfernt, den Kontrollpeak aber am rechten Rand auftragen, überlegten wir, ob unser "systematischer Fehler" nicht vielleicht nur ein Randphänomen sei. Auch Weeke denkt daran, wenn er

empfiehlt, die äußersten Auftragsstellen nicht näher als einen Zentimeter vom Rand entfernt auszustanzen, um den Einfluß des höheren Potentialgradienten an den Seiten auszuschalten ⁵⁶⁾.

Wir hielten diesen Mindestabstand nicht immer ganz ein, beobachteten aber den systematischen Fehler über den ganzen Verlauf der Platte, wenn wir z.B. Normalpersonen bestimmten.

2.2.4.3 Kühlung

Wir vermuteten, daß die durch die Konstruktion des Kühltisches bedingte, ungleichmäßige Kühlung (vergl. S. 29) eine Fehlerquelle sein könnte, kamen aber zu dem Ergebnis, daß der Temperaturgradient innerhalb des Kühltisches bzw. der Gelplatten höchstwahrscheinlich parallel zur Wanderungsrichtung der Plasmaproteine verläuft und so eher qualitativen als quantitativen Einfluß auf die Peaks haben dürfte.

2.2.4.4 Auftragszeit

Schließlich kamen wir zu der Überzeugung, daß der Hauptfaktor in Fällen mit besonders großem systematischen Fehler wohl die zu lange Auftragszeit war. Die Vorspannung während des Auftragens soll zwar eine Vordiffusion der zuerst aufgetragenen Proben verhindern, aber möglicherweise läßt sich dieser Fehler doch nicht ganz ausschalten. Wir empfehlen daher trotz Vorspannung, so rasch wie möglich aufzutragen. Fünf Minuten sind bei großen Platten und gewissenhaftem Arbeiten sehr knapp bemessen, so daß die Grenze von zehn Minuten wohl realistischer ist (vergl. S. 27).

Unter Umständen sollte man doch wieder auf den Vorschlag von Laurell zurückkommen und die Eichkurve in der Mitte der Platte auftragen ³³⁾, was für uns allerdings noch einen zweiten 100 %-Kontrollpeak am linken Plattenrand notwendig machte, um den maximalen Fehler als Differenz der beiden

Kontrollpeaks an den Rändern der Platte angeben zu können.

Wenn die Vordiffusion mit dem Ergebnis zu niedriger Präzipitate bei den zuerst aufgetragenen Proben ⁴⁾ eine nennenswerte Rolle spielt, so ist dieser Einfluß bei unseren Langzeitelektrophoresen, mit vergleichsweise niedriger Spannung relativ größer als bei den Schnellelektrophoresen von Laurell mit einer Spannung von 300 Volt.

Hohe Spannung vermindert also den Einfluß der Vordiffusion, während niedrigere Spannung die Schärfe des Präzipitates und damit die Ablesegenauigkeit erhöht; im ersten Fall sinkt der systematische Fehler, im zweiten der statistische. Empirisch haben wir versucht ein Optimum zwischen den Extremen zu finden.

2.2.5 Fehlerkontrolle

Auf Grund des beschriebenen systematischen Fehlers bemühten wir uns um eine wirksame Fehlerkontrolle. Da unter Annahme der Vordiffusion als Hauptfehlerquelle (vergl. S. 34) der Fehler zwischen der zuletzt und der zuerst aufgetragenen Probe gleich dem maximalen Fehler der Platte ist, tragen wir zur Kontrolle am Ende jeder Platte noch einmal einen Wert der Eichkurve auf; wir haben uns auf den 100 %-Wert festgelegt.

Die Abweichung des Kontrollpeaks vom 100 %-Wert der Eichkurve liefert uns ein Maß für die Güte der Platte. Wir tolerieren keine Fehler über 10 % (bei Faktor XIII 15 % wegen der verhältnismäßig schwachen Präzipitate) und wiederholen bei höheren Abweichungen jeweils die Bestimmungen.

Die Ergebnisse unserer Fehlerkontrolle für alle Platten (einschließlich der Fehler über 10 % bzw. 15 %) sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. In Übereinstimmung mit Laurell fanden wir bei Simultanbestimmungen etwas größere Fehler für den "inneren Peak" ³³⁾.

Tabelle 7

Durchschnittliche Fehler der Kontrollpräzipitate bei den verschiedenen Bestimmungen mit der Immunelektrophorese nach Laurell

	Anzahl der Platten	Durchschnitt- licher Fehler	Standardab- weichung
Faktor XIII	n = 21	$\bar{x} = 9,62 \%$	s = 5,96 %
Antithrombin III (äußerer Peak)	n = 23	$\bar{x} = 4,35 \%$	s = 3,11 %
Faktor VIII (innerer Peak)	n = 22	$\bar{x} = 6,06 \%$	s = 2,79 %
alpha ₁ -Antitrypsin (äußerer Peak)	n = 17	$\bar{x} = 5,47 \%$	s = 4,61 %
alpha ₂ -Makroglobulin (innerer Peak)	n = 16	$\bar{x} = 6,94 \%$	s = 3,21 %

2.2.6 Qualitätskontrolle

Zusätzlich zum Fehler auf ein und derselben Platte versuchen wir auch, die Fehler von Platte zu Platte zu erfassen. Wir bereiteten dazu ein Referenzplasma aus fünf Blutkonserven und lassen jeweils die beiden Verdünnungen mitlaufen, die der 50 %- und 100 %-Verdünnung des Standards entsprechen.

Dieser Aufwand lohnt sich für kleine Platten nicht, weshalb wir inzwischen für gezielte Untersuchungen nur noch große Platten verwenden. Die Zahl der Werte ist vergleichsweise klein, weil wir nicht gleich zu Anfang mit der Qualitätskontrolle begannen.

Die relativ hohen Standardabweichungen beruhen auf den deutlichen Schwankungen der verwendeten Standards. Obwohl wir kommerzielle Präparate verwendeten (s. S. 17 Tab. 6), waren die Unterschiede so erheblich, daß sich

schließlich unser eigener Zitratpool von 25 normalen Spendern als immer noch zuverlässigster Standard erwies (vergl. S. 23). Da die Methode letztlich nur so verlässlich wie ihr Standard ist, werden wir in Zukunft ausschließlich unseren eigenen Pool verwenden.

Tabelle 8

Durchschnittswerte der Plasmaproben zur Qualitätskontrolle für die verschiedenen Bestimmungen mit der Immunelektrophorese nach Laurell

		Anzahl der Platten	Durchschnitts- wert	Standardab- weichung
Faktor XIII	"100 %-Wert"	n = 11	$\bar{x} = 112,18 \%$	s = 12,60 %
	"50 %-Wert"	n = 11	$\bar{x} = 57,82 \%$	s = 11,22 %
Antithrombin III	"100 %-Wert"	n = 10	$\bar{x} = 112,60 \%$	s = 11,70 %
	"50 %-Wert"	n = 9	$\bar{x} = 63,78 \%$	s = 8,97 %
Faktor-VIII Antigen	"100 %-Wert"	n = 7	$\bar{x} = 111,43 \%$	s = 17,94 %
	"50 %-Wert"	n = 8	$\bar{x} = 59,50 \%$	s = 8,91 %
α_1 -Antitrypsin	"100 %-Wert"	n = 7	$\bar{x} = 77,43 \%$	s = 8,38 %
	"50 %-Wert"	n = 6	$\bar{x} = 40,67 \%$	s = 3,27 %
α_2 -Makroglobulin	"100 %-Wert"	n = 9	$\bar{x} = 72,44 \%$	s = 6,17 %
	"50 %-Wert"	n = 6	$\bar{x} = 38,50 \%$	s = 3,67 %

C . E R G E B N I S S E

=====

1. METHODISCHE ERGEBNISSE

1.1 NORMALWERTE FÜR DIE METHODIK NACH LAURELL

Wir bestimmten die Normalwerte von gesunden Spendern zwischen 18 und 44 Jahren. Für Faktor-VIII-assoziiertes Antigen bemühten wir uns wegen der großen Streuung um eine besonders hohe Fallzahl.

Tabelle 9

Normalwerte der verschiedenen Immunelektrophoresen nach Laurell

	Anzahl der Normalpersonen	Durchschnittswert	Standardab- weichung
Faktor XIII	n = 83	$\bar{x} = 100,04 \%$	s = 19,14 %
Antithrombin III	n = 104	$\bar{x} = 108,68 \%$	s = 15,70 %
Faktor-VIII-ass. Antigen	n = 239	$\bar{x} = 90,18 \%$	s = 33,44 %
alpha ₁ -Antitrypsin	n = 120	$\bar{x} = 97,63 \%$	s = 26,00 %
alpha ₂ -Makroglobulin	n = 120	$\bar{x} = 83,81 \%$	s = 29,79 %

Als Standard verwendeten wir unseren eigenen Zitratplasmapool (vergl. S 23).

1.2 METHODENVERGLEICH

Die Immunelektrophorese nach Laurell stimmt mit anderen Methoden vorzüglich überein. Wir verteilten Plasmen von Patienten mit möglichst unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Faktoren auf mehrere Tage und Platten und führten anschließend Doppelbestimmungen mit anderen Methoden durch.

Im einzelnen verglichen wir die Immunelektrophorese nach Laurell mit dem Antiserum-Hemmtest für Faktor XIII nach Bohn und Haupt, der photometrischen Aktivitätsmessung von Antithrombin III mit dem Substrat S-2160 und der nach Egli gemessenen Aktivität von Faktor VIII ^{3) 10)}. Die Ergebnisse waren in allen drei Vergleichsserien nach dem t-Test hochsignifikant positiv korreliert (s. Tab. 10).

Tabelle 10

Vergleich der Immunelektrophoresen nach Laurell mit einigen anderen Methoden an Hand von Doppelbestimmungen

	F XIII Laurell/ Bohn und Haupt	AT XIII Laurell/ Photometrisch (S 2160)	F VIII Laurell/ Egli
Wertspare	n = 36	n = 32	n = 65
Korrelationskoeffizient	r = 0,73	r = 0,56	r = 0,42
Prüfmas	t = 6,16	t = 3,70	t = 3,60
Irrtumswahrscheinlichkeit einer positiven Korrelation	unter 0,0001	unter 0,001	unter 0,001

2. BESTIMMUNGEN BEI CHIRURGISCHEN PATIENTEN

Der Vergleich der Labordaten innerhalb und zwischen den Gruppen ergibt für einige Faktoren ein auffallendes und nach dem t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben auf dem 5 % Niveau statistisch gesichertes Verhalten.

Bei den Patienten mit Bauchwanddehiscenz (Gruppe IIb) trugen wir für den sechsten postoperativen Tag den Mittelwert aller Werte bei Wundruptur in die Graphen ein; da der Platzbauch durchschnittlich am sechsten postoperativen Tag auftrat (vergl. S. 6).

2.1 BLUTBILD

2.1.1 Hämoglobin und Hämatokrit

Hämoglobin und Hämatokrit sind in der Platzbauchgruppe IIb mit Werten von 9 - 10 g% bzw. um 30 % deutlich vermindert, zeigen aber keine statistisch signifikanten Veränderungen.

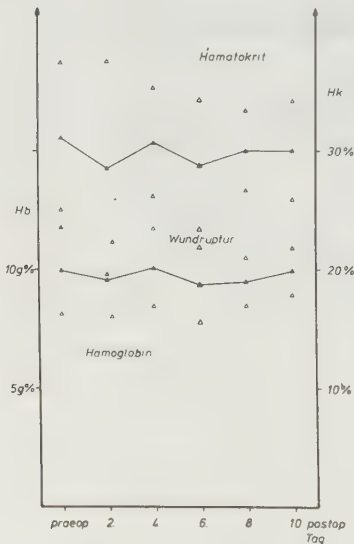


Abb. 5 : Verhalten von Hämoglobin und Hämatokrit bei Patienten mit Wundruptur (Gruppe IIb). Die Dreiecks-umrisse geben den Bereich der Standardabweichung an.

2.1.2 Leukozyten

Der Anstieg der Leukozyten in der Gruppe IIb vom sechsten zum achten postoperativen Tag ist nicht signifikant; möglicherweise wegen der geringen Zahl

der Werte am achten postoperativen Tag (manche Patienten starben schon vorher). Die absoluten Leukozytenzahlen sind allerdings deutlich erhöht.

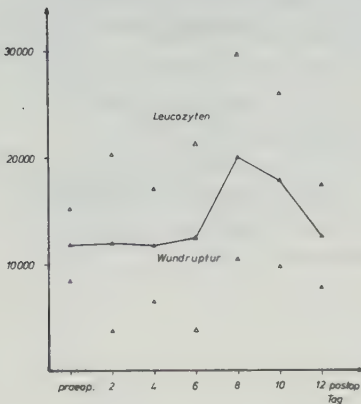


Abb. 6 : Verlauf der Leukozyten bei Patienten mit Platzbauch (Gruppe IIb).

2.1.3 Gesamteiweiß

Der postoperative Abfall sowie der folgende Anstieg des Gesamteiweißes sind zwar in allen Fällen zu beobachten, aber nicht signifikant.

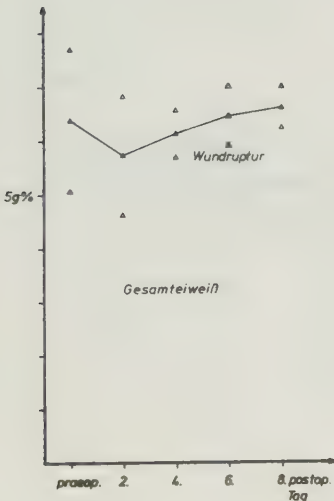


Abb. 7 : Verlauf des Gesamteiweißes bei Patienten mit postoperativer Wunddehiszenz (Gruppe IIb). Die Dreieckssummen geben den Bereich der Standardabweichung an.

2.2 GLOBALTESTS

Über die speziell von uns untersuchten Parameter hinaus nahmen wir mit Quick-Test, partieller Thromboplastinzeit und Thrombinzeit auch ein globales Screeningprogramm der plasmatischen Gerinnung in unsere Studie auf.

2.2.1 Quickwert

Der Quickwert fällt in der Normalgruppe postoperativ signifikant ab. Nur bei den Platzbauchpatienten unterschreiten die Absolutwerte die Norm deutlich.

2.2.2 Partielle Thromboplastinzeit

Zwischen den Gruppen fanden sich keine statistisch faßbaren Unterschiede. Lediglich in der Gruppe IIb (Patienten mit Bauchwanddehiszenz) scheinen die Werte am sechsten postoperativen Tag etwas erhöht zu sein, liegen aber noch im Normbereich.

2.2.3 Thrombinzeit

Um die Werte vergleichen zu können bildeten wir den Quotienten aus dem Meßwert und der Tagesnorm. Alle Werte bewegen sich im Normbereich und nirgends zeigen sich signifikante Unterschiede.

2.3 THROMBOZYTEN

Die Ergebnisse lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Nach dem zweiten postoperativen Tag steigen die Thrombozyten in der Gruppe IIa zum zehnten postoperativen Tag signifikant an. Am zehnten postoperativen Tag besteht auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe I und der Platzbauchgruppe IIb.

Das Verhalten innerhalb der Gruppen war teilweise gegenseitig. In der Gruppe IIa und besonders IIb gab es vor und nach der Wundruptur massive Thrombopenien mit Werten deutlich unter 50 000.

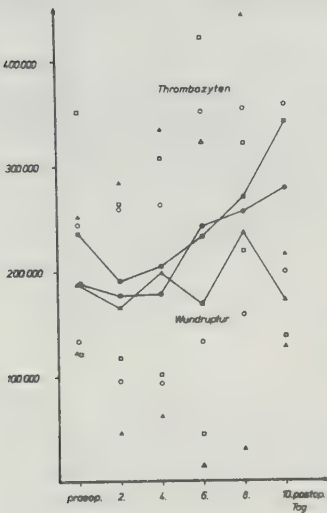


Abb. 8 : Novocain-Zählung der Thrombozyten nach Marx ³⁹⁾. Die ausgefüllten Kreise entsprechen der Normalgruppe I, die Quadrate der Gruppe der Risikopatienten ohne Wundruptur (IIa) und die Dreiecke der Patientengruppe mit Bauchwanddehiszenz (IIb). Die Umrisse der geometrischen Figuren geben jeweils die zugehörige Standardabweichung an.

2.4 GERINNUNGSFAKTOREN

2.4.1 Fibrinogen und Fibrinmonomere

2.4.1.1 Hitzefibrinogen nach Schulz ³⁾

Gruppe I und IIb zeigen weder signifikante Veränderungen noch signifikante Unterschiede, während die Risikogruppe IIa einen ganz eigenen Verlauf hat. Die Werte scheinen schon präoperativ leicht erhöht zu sein und steigen bis zum achten postoperativen Tag signifikant an; am achten postoperativen Tag ist auch der Unterschied zur Kontrollgruppe I signifikant.

Die höchsten praeoperativen Werte finden sich bei Patienten mit Wundruptur (Gruppe IIb), die später starben. Bei ihnen fällt das Fibrinogen aber postoperativ ab, als sei hier die äußerste Grenze der möglichen Kompensation schon überschritten.

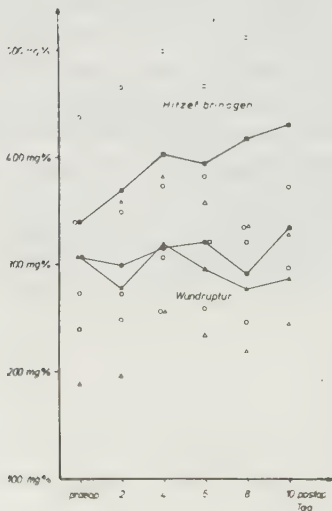


Abb. 9 : Bestimmung des Hitzefibrinogens nach Schulz ³⁾. Kreisflächen bezeichnen die Kontrollgruppe I, Quadrate den Verlauf der Risiko-Gruppe IIa und Dreiecksflächen die Mittelwerte der Patienten mit Bauchwanddehiscenz (Gruppe IIb). Die Umrisse dieser Zeichen grenzen die zugehörigen Standardabweichungen ein.

2.4.1.2 Äthanoltest nach Godal ³⁾

Positive Godaltests scheinen in der Risikogruppe, IIa und der Kontrollgruppe, I häufiger zu sein als bei den Patienten mit Platzbauch (Gruppe IIb), bei denen wir insgesamt nur zwei Mal ein positives Ergebnis erhielten.

Bemerkenswert scheint zu sein, daß nur in der Gruppe IIa praeoperativ positive Godaltests auftraten.

Wegen der geringen Fallzahl sehen wir diese Ergebnisse sehr kritisch.

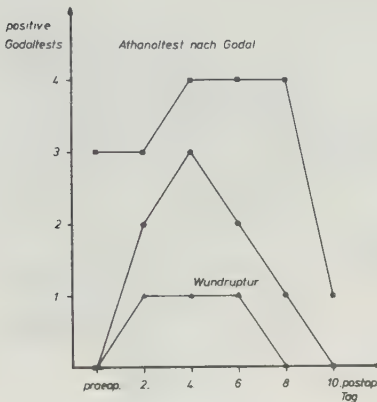


Abb. 10 : Bestimmung der Fibrinmonomere nach Godal ³⁾.
Die runden Symbole stehen für die Mittelwerte in der Normalgruppe, I, die quadratischen für die Patienten mit Risiko aber ohne Wundruptur der Gruppe IIa und die dreieckigen Zeichen für die Patienten mit postoperativer Bauchwanddehiszenz (Gruppe IIb).

2.4.2 Alpha₂-Makroglobulin nach Laurell

Die Werte fallen in der Normalgruppe, I und in der Risikogruppe, IIa signifikant zum zweiten postoperativen Tag ab und steigen in Gruppe IIa nach dem achten postoperativen Tag wieder signifikant an. Gruppe IIb zeigt keine signifikanten Veränderungen.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

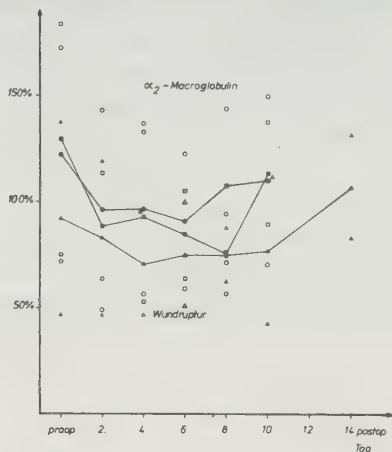


Abb. 11 : Bestimmung von α_2 -Makroglobulin nach Laurell. Runde Zeichen stehen für Gruppe I, quadratische für Gruppe IIa und dreieckige für Gruppe IIb. Die Umrisse der Symbole grenzen die zugehörigen Standardabweichungen ein.

2.4.3 Alpha₁-Antitrypsin nach Laurell

Bei allen Gruppen steigt α_1 -Antitrypsin postoperativ an; scheinbar um so steiler, je höher das Risiko der Patientengruppe ist. In Kontrollgruppe, I ist der Anstieg bis zum sechsten, in Risikogruppe, IIa bis zum vierten und in der Bauchwanddehissenzgruppe, IIb bis zum zweiten postoperativen Tag signifikant.

In Gruppe I und IIb sinken die Werte nach dem sechsten postoperativen Tag signifikant ab, während sie in der Gruppe IIa erhöht zu bleiben scheinen.

Im Vergleich der Gruppen ist lediglich am sechsten

postoperativen Tag der Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe IIb signifikant.

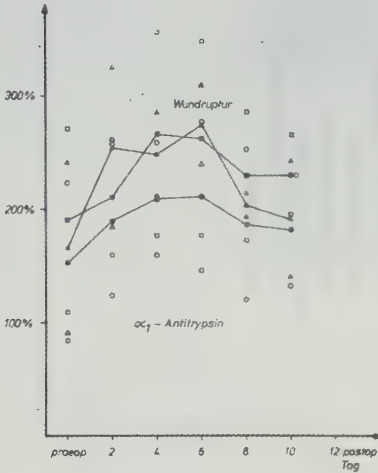


Abb. 12 : Bestimmung von alpha₁-Antitrypsin nach Laurell. Ausgefüllte Kreisflächen entsprechen der Normalgruppe, I, Quadrate der Gruppe der Risikopatienten ohne Platzbauch und die Dreiecke der Patientengruppe mit Bauchwandruptur. Die Umrisse der Zeichen geben die Standardabweichungen an.

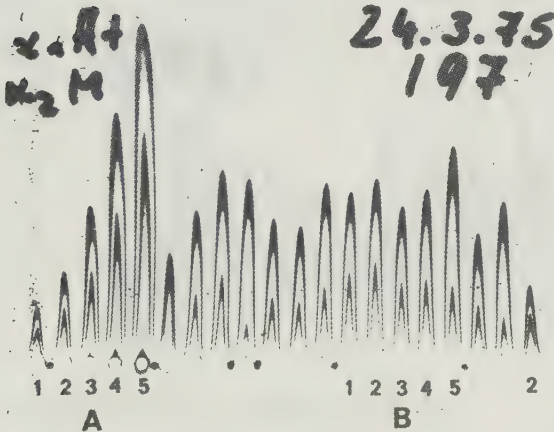


Abb. 13 : Simultanbestimmung von alpha₁-Antitrypsin und alpha₂-Makroglobulin (innerer Peak) nach Laurell. Über A die Eichkurvenverdünnungen, über B Verlauf eines Patienten der Normalgruppe, I (praeop., 2., 5., 8., und 11. postop. Tag).

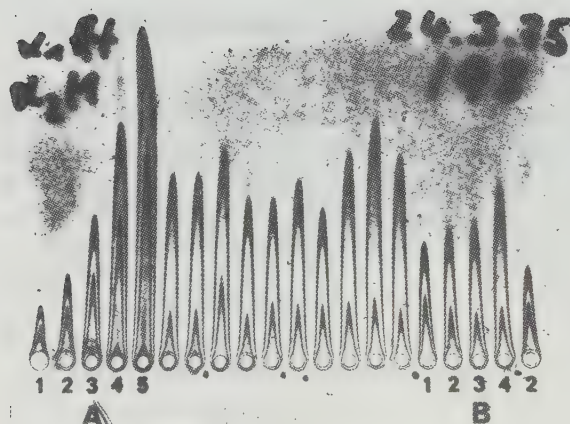


Abb. 14 : Simultanbestimmung von α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin (innerer peak) nach Laurell. Über A, die Eichverdünnungen (1-5), über B (1-4), Verlauf einer Patientin der Gruppe IIa (praeop., 2., 5. und 7. postop. Tag).

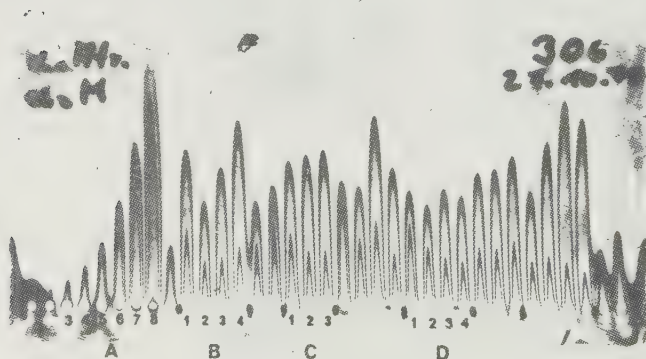


Abb. 15 : Simultanbestimmung von α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin (innerer peak) nach Laurell. Über A, Eichverdünnungen, über B (1-4) und C (1-3), zwei Patienten der Gruppe IIa (praeop., 2., 4., 6. bzw. praeop., 2. und 6. postoperativer Tag). - Im Vergleich dazu über D (1-4), Patientin der Gruppe IIb (praeop., 2., 4. und 6. postop. Tag). mit einer Wunddehiszenz schon am dritten postoperativen Tag.

2.4.4 Faktor-VIII-assoziertes Antigen nach Laurell

Faktor-VIII-assoziertes Antigen steigt in Gruppe II postoperativ stärker an als in Gruppe I. Während die Werte in der Platzbauchgruppe, IIb nur am vierten postoperativen Tag signifikant über denen der Kontrollgruppe, I liegen, besteht in der Risikogruppe, IIa vom vierten bis zum achten postoperativen Tag ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Werte der Patienten mit Wunddehiszenz liegen zwischen denen von Normal- und Risikopatienten.

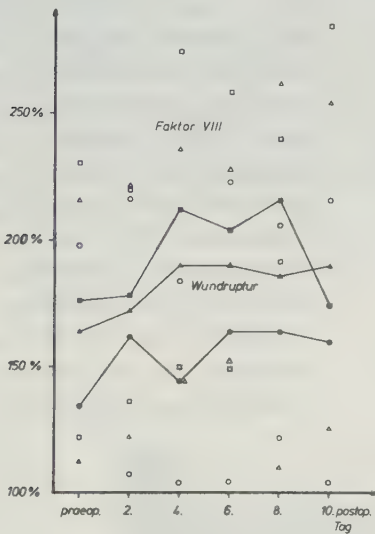


Abb. 16 : Bestimmung des Faktor-VIII-assozierten Antigens nach Laurell. Runde Symbole stehen für Gruppe I, quadratische für Gruppe IIa und dreieckige für Gruppe IIb. Die Umrisse geben die jeweils zugehörigen Standardabweichungen an.

2.4.5 Antithrombin III nach Laurell

Alle drei Kurven sehen sich recht ähnlich, haben eine Art Wannenform und unterscheiden sich nur in ihren Absolutwerten. Antithrombin III fällt in allen Gruppen zum zweiten postoperativen Tag signifikant ab, der nachfolgende Anstieg ist aber nur bei den Patienten mit Wundruptur vom vierten

bis zum zehnten Tag signifikant.

Gruppe IIb unterscheidet sich bis zum sechsten postoperativen Tag signifikant von Gruppe IIa und der Kontrollgruppe, während Gruppe IIa nur am sechsten postoperativen Tag einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zeigt. Gruppe IIa liegt mit allen Werten zwischen den Gruppen I und IIb.

Die tiefsten Werte von Antithrombin III fanden wir in Gruppe IIb bei den Patienten, die starben; nur bei ihnen sank Antithrombin III unter 60 %.

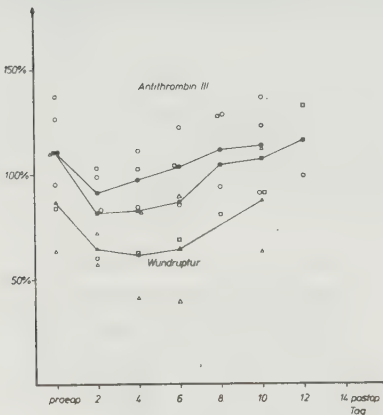


Abb. 17 : Bestimmung von Antithrombin III nach Laurell. Ausgefüllte Kreisflächen entsprechen der Kontrollgruppe, I, Quadrate der Gruppe der Risikopatienten ohne Wundruptur, IIa und die Dreiecke der Patienten-Gruppe mit Bauchwanddehiscenz, IIb. Die Umrisse der Symbole grenzen die Standardabweichung ein.

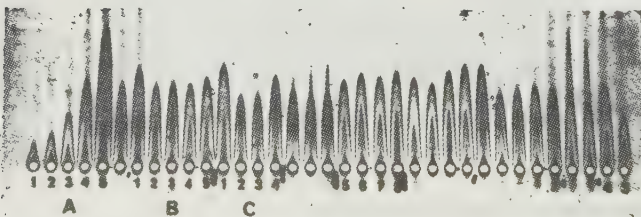


Abb. 18 : Simultanbestimmung von Antithrombin III und Faktor-VIII-assoziiertem Antigen. Über A, Eichverdünnungen, über B (1-5) Patient der Normalgruppe, I (praeop., 2., 4., 6. und 10. postoperativer Tag), über C (1-4), Patientin der Gruppe IIb (praeoperativ, 4., 7. und 12. postoperativer Tag), die am sechsten postoperativen Tag eine Wunddehiscenz bekam.

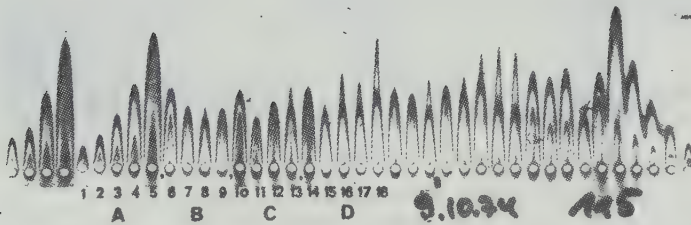


Abb. 19 : Simultanbestimmung von Antithrombin III und Faktor-VIII-assoziiertem Antigen. Über A (1-5), fortlaufende Verdünnungen des Referenzplasmas für die Eichkurve, über C (10-13) und D (14-18), Patienten der Gruppe mit Risiko aber ohne Wundruptur, IIa (praeoperativ, 2., 4., 7., bzw. praeoperativ, 2., 4., 7. und 11. postoperativer Tag).- Im Vergleich dazu über B (6-9), Patientin der Gruppe IIb (praeoperativ, 2., 4. und 6. postoperativer Tag), die schon am dritten postoperativen Tag eine Bauchwanddehiscenz bekam.

2.4.6 Faktor XIII

2.4.6.1 Bestimmung nach Laurell

Die Methode ist genauer als die Bestimmung nach Bohn und Haupt; leider sind die Fallzahlen geringer. Die Ergebnisse beider Methoden stimmen überein.

In der Normalgruppe, I und bei den Patienten mit Risiko aber ohne Bauchwandruptur, IIa fällt der Faktor XIII postoperativ signifikant ab. Der Tiefpunkt scheint bei höherem Risiko später zu liegen.

Die Plasmaspiegel liegen für den ganzen Verlauf bei den Patienten mit Bauchwanddehiszenz, Gruppe IIb signifikant unter denen der Kontrollgruppe. Gruppe IIa zeigt bis zum vierten postoperativen Tag keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe IIb, liegt aber ab dem sechsten postoperativen Tag (durchschnittlicher Zeitpunkt der Wundruptur - vergl. S. 6) signifikant darüber.

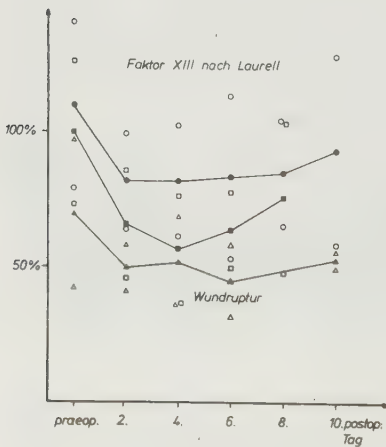


Abb. 20 : Bestimmung von Faktor XIII nach Laurell. Runde Zeichen stehen für Gruppe I, quadratische für Gruppe IIa und dreieckige für Gruppe IIb. Die Umrisse der Symbole geben die Standardabweichungen an.

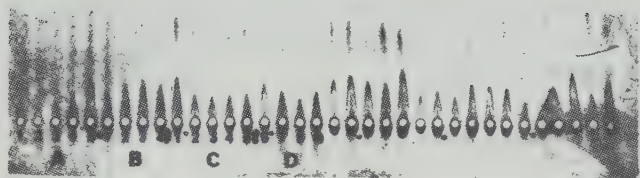


Abb. 21 : Bestimmung von Faktor XIII nach Laurell. Über A (1-5), die Eichkurvenverdünnungen, über B (1-4) eine Patientin der Normalgruppe (praeoperativ, 4. 6. und 9. postoperativer Tag), über C (1-5) und D (6-9) zwei Patientinnen (praeoperativ, 2., 4., 6., 10., bzw. praeop., 4., 7. und 11. postoperativer Tag), die beide am sechsten postoperativen Tag eine Bauchwanddehiszenz bekamen.



Abb. 22 : Bestimmung von Faktor XIII nach Laurell. Über A (1-5), die Eichproben, über C (1-5) eine Patientin der der Kontrollgruppe (praeoperativ, 2., 5., 8. und 11. postoperativer Tag). - Im Vergleich dazu eine Patientin der Gruppe IIb (praeoperativ, 2., 4., 8., 10., 12., 15., 17., und 21. postoperativer Tag) über B (1-9), die schon am dritten postoperativen Tag eine Bauchwanddehiszenz bekam und am 21. postoperativen Tag starb.

2.4.6.2 Bestimmung nach Bohn und Haupt ¹⁰⁾

In allen drei Gruppen fällt der Faktor XIII postoperativ signifikant ab, erholt sich aber nur in den Gruppen I und IIa wieder signifikant. Der tiefste Punkt scheint

um so später zu liegen, je höher das Risiko ist; in Gruppe I am vierten, in Gruppe IIa am sechsten und in Gruppe IIb am achten postoperativen Tag.

Die tiefsten Werte fanden wir bei den Patienten, die starben. Bei ihnen sank Faktor XIII jeweils unter 50 % (vergl. Abb. 22).

Der Vergleich zwischen den Gruppen zeigt die Kontrollgruppe, I und die Gruppe der Patienten mit Bauchwanddehiscenz als extreme Verlaufstypen, während die Risikogruppe, IIa in ihrem Verhalten zwischen den beiden wechselt. Praeoperativ und bis zum sechsten postoperativen Tag unterscheiden sich die Gruppen IIa und IIb nicht voneinander aber beide signifikant von der Kontrollgruppe. Nach dem sechsten postoperativen Tag nähert sich das Verhalten der Risikogruppe, IIa dem der Normalgruppe, I an (als ob die Entwicklung doch noch einen angenähert normalen Verlauf nähme bzw. eine Kompensation noch gelänge, die die Wundruptur verhindert). Nun unterscheiden sich die Gruppen IIa und I beide signifikant von der Gruppe IIb, aber nicht mehr voneinander.

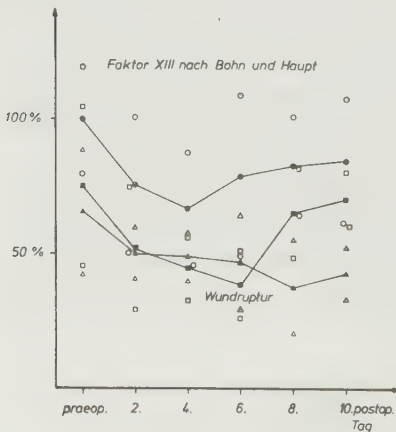


Abb. 23 : Bestimmung von Faktor XIII nach Bohn und Haupt¹⁰⁾. Die Kreisflächen entsprechen der Normalgruppe, I, die Quadratflächen der Risikogruppe ohne Wundruptur, IIa und die Dreiecke der Gruppe mit Bauchwanddehiscenz, IIb. Die Umrisse der Zeichen begrenzen die Standardabweichung.

D . D I S K U S S I O N

=====

1. METHODENVERGLEICH

Wir wiesen die gute Übereinstimmung der Methode nach Laurell mit anderen quantitativen Bestimmungen von Faktor XIII, Antithrombin III und Faktor-VIII-assoziiertem Antigen nach. Der Elektroimmunoassay ist einfacher durchzuführen und empfindlicher als vergleichbare andere Methoden. Unserer Ansicht nach kann er deshalb einen wesentlichen Beitrag zur Erkennung und Überwachung von Patienten mit risikoreicher Wundheilung leisten.

2. KLINISCHE EINSCHÄTZUNG DES RISIKOS FÜR WUNDEHISZENZEN

Zusammen mit den klinischen Risikofaktoren ⁴⁵⁾, die sich in unserer prospektiven Studie bewährten, halten wir es für möglich, "die Gefährdung des speziellen Patienten rechtzeitig zu erkennen", worin Seidel noch das "Hauptproblem des Chirurgen" sah ⁴⁸⁾. Liegt in der Literatur die durchschnittliche Inzidenz der postoperativen Wunddehiszenz bei etwa 1 % aller Laparotomien ^{9) 8)}, so erlitten bei unserer Vorauswahl von 28 Risikopatienten immerhin 12 (43 %) eine Bauchwandruptur; von diesen 12 verstarben 7 Patienten.

3. BLUTBILD

3.1 HAEMOGLOBIN UND HAEMATOKRIT

Schmidtler et al. konnten zeigen, daß mit sinkender Haemoglobinkonzentration das Risiko für eine Bauchwanddehiszenz erheblich steigt ⁴⁵⁾. Tatsächlich lagen bei unseren Patienten mit Platzbauch (Gruppe IIb) die Haemoglobinkonzentrationen im Durchschnitt prae- und postoperativ unter 10 % bei Haematokritwerten um 30 %. Der Verlauf zeigte allerdings nach keiner Richtung auffällige Veränderungen (Abb. 5, S. 40).

3.2 LEUKOZYTEN UND INFektion

Die Zahl der Leukozyten in der Platzbauchgruppe, IIb ist schon praeoperativ mit über 11 000 deutlich erhöht und steigt bis zum durchschnittlichen Tag der Wundruptur noch auf rund 20 000 an (Abb. 6, S. 41). Möglicherweise ist dies als Hinweis auf die Bedeutung der Infektion als eine der wichtigsten Ursachen zu verstehen ^{1) 9) 14) 20) 22) 43) 45) 48)}.

Bei unseren Patienten mit Bauchwanddehiszenz waren in neun von zwölf Fällen im Wundabstrich, in der Blutkultur oder an den Venenkatheterspitzen eine Infektion nachweisbar. Es fiel auf, daß sich fast ohne Ausnahme Escherichia coli, Enterokokken oder Klebsiellen fanden. Bei drei Patienten bestand klinisch eine Sepsis, bei zwei weiteren Verdacht auf Sepsis.

Die infizierte Wunde bleibt nach Dittrich im Stadium der entzündlichen (katabolen) Veränderungen stehen, was zu anhaltender lokaler Azidose, verstärkter Exsudation, Leukozytenemigration und Nekrolyse führt. Die Azidose bewirkt eine dauernde Aktivierung saurer, nekrolytischer Lysosomenenzyme bis zur Erschöpfung der Lysosomen. Gleichzeitig können aber auch die anabolen Enzyme mit neutralem pH-Optimum

nicht aktiviert werden, so daß reparative Mechanismen nur unzureichend und sehr verzögert in Gang kommen können ¹⁴⁾. Daß Serome bei 50 % der Bauchwanddehiscenzen als Frühsymptom auftreten (vergl. S. 1), kann wohl als Hinweis auf entzündlich exsudatives Geschehen verstanden werden.

4. GLOBALTESTS

Die Globaltests sind vermutlich zu grob, um die komplizierte Haemostasestörung beim Platzbauch erfassen zu können und zeigten keine nennenswerten Unterschiede innerhalb oder zwischen den Gruppen.

5. THROMBOZYTEN UND THROMBOZYTEN-FAKTOR XIII

Die Thrombozytenzahlen liegen bei den Patienten mit Wundruptur (Gruppe IIb) signifikant unter denen der Kontrollgruppe (Gruppe I), während die Werte in der Risikogruppe (Gruppe IIa) vom zweiten postoperativen Tag an signifikant ansteigen und noch über der Kontrollgruppe liegen (Abb. 8, S. 43). Möglicherweise ist dieser Anstieg in der Risikogruppe, IIa als Kompensation zu verstehen, vielleicht weil der Thrombozytenbedarf in dieser Situation gesteigert ist und selbst sonst normale Thrombozytenwerte nicht ausreichen, um mit einer drohenden Bauchwanddehiscenz fertig zu werden. Zudem sahen wir bei den Patienten mit Wundruptur mehrere Thrombopenien, zum Teil weit unter 50 000.

Die Verminderung der Thrombozytenzahlen könnte über die dadurch eingeschränkte Verfügbarkeit von Plättchenfaktor III zur geringeren Thrombinbildung und als Folge zur verzögerten Bildung und Stabilisierung (über Faktor XIII) von Fibrin führen ^{3a)}.

Zu diesem quantitativen Defekt der Thrombozyten besteht vermutlich auch eine qualitative Störung iatrogen durch Pharmaka, z.B. Schmerzmittel, Antibiotika und Dextrane.

Zusätzlich wirkt diese zumindest relative Thrombopenie vielleicht synergistisch zum Mangel an Plasma-Faktor-XIII (vergl. Abschnitt 6.1), da ja etwa die Hälfte des gesamten Faktor XIII Bestandteil der Blutplättchen ist, die ihn bei Gerinnungsvorgängen rasch abgeben können.

Da unsere Thrombozytenverläufe, besonders bei den Patienten mit Bauchwanddehiszenz, den Kurven von Thrombozyten-Faktor-XIII nach Letheby et al. sehr ähnlich sehen, ließe sich von der Thrombozytenzahl auf die Menge an Thrombozyten-Faktor-XIII schließen ^{24) 25) 35)}.

6. GERINNUNGSFAKTOREN

6.1 FAKTOR XIII

Wir beachten den Thrombozyten-Faktor-XIII besonders, weil verschiedene Autoren ^{19) 20)} den Eindruck entstehen ließen, Plasma-Faktor-XIII-Mangel sei das wichtigste pathogenetische Prinzip bei Wundheilungsstörungen. Wir glauben zeigen zu können, daß diese Vereinfachung bei dem komplexen System der Blutstillung und Wundheilung, ebenso unzulässig wie unrichtig ist.

Wir fanden in allen drei Gruppen postoperativ signifikante Plasma-Faktor-XIII-Verminderungen. In der Risikogruppe, II waren die Werte schon praeoperativ deutlich vermindert. Aber unmittelbar postoperativ waren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppe II zu finden. Erst nach dem sechsten postoperativen Tag, also nach dem mittleren Termin der Bauchwanddehiszenz, wird die Entwicklung in Gruppe IIa und Gruppe IIb gegenläufig. Nun steigt Faktor XIII bei ungestörter Wundheilung fast wieder bis zum Ausgangswert an, während er bei den Patienten mit Wundruptur zum achten postoperativen Tag weiter abfällt und anschließend tief bleibt (Abb. 20 und 23).

Der erniedrigte praeoperative Wert von Faktor XIII läßt also nicht ohne weiteres eine Wundruptur erwarten. Wesentlich ist, ob die schon "physiologische" postoperative Haemostaseveränderung durch die körpereigenen Kompensationsmechanismen überwunden werden kann ^{13) 25) 34) 51)}. Cassau beschrieb, daß erniedrigte Faktor-XIII-Werte durch "Hyperreaktion der Fibrinogenbildung und reduzierte Fibrinolyse" kompensiert werden können ¹³⁾. Hosenfeld beschrieb ebenfalls postoperative Fibrinogenanstiege und zusätzlich steigende Thrombozytenzahlen (wie bei uns in der Kontrollgruppe und vor allem der Risikogruppe) ²⁵⁾.

6.2 FIBRINOGEN UND WUNDDYSTHROMBIE

Die Fibrinogenkonzentration nimmt bei unseren Patienten mit erhöhtem Risiko aber ungestörter Wundheilung (Gruppe IIa) postoperativ deutlich zu - "akutes Phasen-Protein" - noch bevor Faktor XIII kompensatorisch anzusteigen beginnt. Man könnte an einen Kompensationsmechanismus zur Ausbildung eines festeren lokalen Wundthrombus denken.

Zur Fibrinstabilisierung ist wesentlich, wie viel Faktor XIII durch Thrombin, unter Mitwirkung von Ca-Ionen, zu aktiver Transglutaminase (Faktor XIII) umgewandelt werden kann; die immunologischen Faktor-XIII-Bestimmungen umfassen dagegen nur das Faktor-XIII-Molekül als Antigen.

Bedenkt man, daß zusätzlich pharmakogene Thrombopathien durch Schmerzmittel und Antibiotika, Thrombinhemmung durch Heparin und eine Alteration der Fibrinpolymerisation durch Dextrane (z.B. Macrodex) und Fibrinogenspaltprodukte (besonders in Gruppe II, vergl. Abschnitt 6.3.2) bei den meisten Patienten wirksam waren, so wird klar, wie vielschichtig die Problematik ist.

6.3 ANTITHROMBINE UND ANTIPLASMINE

6.3.1 Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin

Tierversuche und Anwendungen am Patienten unterstreichen die Bedeutung von Thrombin, Fibrinogen und Faktor XIII. Die Kombination der drei Faktoren mit Antifibrinolytika wurde mit Erfolg als Gewebekleber ("Fibrinkleber" Immuno) zur Haut- und Nerventransplantation, in der Herzchirurgie zur Patchabdichtung, bei Leberrupturen und auch zur lokalen Blutstillung sogar bei Hemmkörperhaemophilen verwendet ¹¹⁾ 41) 47a) 50).

Bei Aktivierung der Blutgerinnung wird Thrombin in großen Mengen gebildet. Der beträchtliche Thrombinüberschuß bei Gerinnungsvorgängen bedingt die Bedeutung der Antithrombine. Antithrombin III macht etwa 80 - 90 % der Antithrombinaktivität aus und ist ein langsam wirkendes Progressivantithrombin, dessen Reaktionsgeschwindigkeit bei Katalyse durch Heparin aber so gesteigert werden kann, daß eine Soforthemmung von Thrombin eintritt. α_2 -Makroglobulin ist das physiologische Sofortantithrombin und bestreitet die restlichen rund 10 % Antithrombinaktivität.

Beide Antithrombine zeigten ein völlig entsprechendes Verhalten. Die Patienten der Kontrollgruppe (Gruppe I) hatten bei beiden Antithrombinen die höchsten Spiegel, die Risikogruppe (IIa) lag in beiden Fällen in der Mitte und die Patienten mit Wundruptur (Gruppe IIb) lagen mit allen Werten unter der Kontroll- und der Risikogruppe. Dieses Verhalten ist allerdings beim Antithrombin III ausgeprägter als beim α_2 -Makroglobulin, wo die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant sind. Schon praeoperativ lagen die Werte bei beiden Antithrombinen in der Platzbauchgruppe deutlich unter denen der beiden anderen Gruppen. In der Risikogruppe sanken die Werte der Antithrombine postoperativ tiefer als in der Kontrollgruppe, erreichten deren Höhe aber wieder am zehnten postoperativen Tag. Dies ist vielleicht als

Kompensationsmechanismus zu werten, weil bei den Patienten mit Bauchwanddehiszenz die Werte tief bleiben und sich nur sehr langsam wieder erholen (Abb. 11 und 17).

Das Verhalten der Kontrollgruppe zeigt, daß das Absinken der Antithrombine Ausdruck der postoperativen Hyperkoagulabilität ist. Mit steigendem Risiko einer Wundruptur nimmt diese thrombophile Diathese mehr und mehr zu, bis sie bei den Patienten der Platzbauchgruppe möglicherweise in einer ausgeprägten Verbrauchskoagulopathie, mindestens aber einer Umsatzsteigerung der Gerinnungsfaktoren einmündet. Vielleicht traten deshalb Antithrombin-III-Werte unter 60 % nur bei letalem Ausgang der Wundheilungsstörung auf. Der Antithrombin-III-Verbrauch ist um so gravierender, als Antithrombin III langsamer als andere Gerinnungsfaktoren nachsynthetisiert wird ^{51a}).

Antithrombin-III- wie Thrombozytenmangel können teilweise aber auch Symptom der Begleitinfektion sein, die ja bei den Patienten mit Wundruptur besonders häufig ist (vergl. Abschnitt 3.2). Zwischen den Patienten mit und ohne nachgewiesener Sepsis bestanden allerdings keine eindeutigen Unterschiede.

Zudem ist auch zu berücksichtigen, daß α_2 -Makroglobulin und Antithrombin III schwache Inhibitoren des Plasmins sind.

6.3.2 α_1 -Antitrypsin und Fibrinolyse

Die quantitative Bedeutung von α_1 -Antitrypsin (ebenso wie α_2 -Makroglobulin) als Plasminhemmstoff wird seit der Entdeckung des "Plasmininaktivators" α_2 -Plasmin Inhibitor wieder diskutiert ^{2a) 28a}).

α_1 -Antitrypsin steigt in allen drei Gruppen postoperativ signifikant an und zwar um so rascher je höher das Risiko einer Wundruptur ist. Innerhalb der Gruppe II sind die höchsten Werte etwa gleich, allerdings fällt α_1 -Antitrypsin bei den Patienten mit Bauchwanddehiszenz

nach dem sechsten postoperativen Tag signifikant ab, während in den beiden anderen Gruppen die Spiegel allmählich absinken, aber noch deutlich über den Ausgangswerten bleiben. Dieser starke Abfall in der Platzbauchgruppe könnte durch eine Verbrauchskoagulopathie (DIC) mit reaktiver Fibrinolyse bedingt sein, oder von einer Inaktivierung durch vermehrte Granulozytenproteasen herrühren ²⁹⁾.

Auf eine latente Verbrauchskoagulopathie deutet möglicherweise auch das vermehrte Auftreten von Fibrin-Fibrinogenspaltprodukten in der Gruppe II. Zwischen den Gruppen IIa und IIb konnten wir allerdings keine sicheren Unterschiede finden. Inwieweit dieser Befund auf die Resorption von Fibrin und Fibrinogen aus Exsudaten hinweist, ist schwer zu sagen. Unter dieser Voraussetzung müßte man allerdings Fibrin-Fibrinogenspaltprodukte in allen Gruppen finden.

6.4 FAKTOR-VIII-ASSOZIIERTES ANTIGEN

Beim Faktor-VIII-assoziierten Antigen, das ebenfalls ein Akutphasenprotein darstellt, liegen die Werte in der Gruppe II über der Kontrollgruppe. Am höchsten und vom vierten bis zum achten Tag signifikant über die Kontrollgruppe stiegen die Werte bei den Patienten, die trotz Risiko keine Wundruptur bekamen, Gruppe IIa (Abb. 16, S. 49).

7. URSACHEN UND WIRKUNGEN DER WUNDDYSTHROMBIE

7.1 URSACHEN

Die Wunddysthrombie bei unseren Patienten mit Wundruptur hat nicht nur einen quantitativen Aspekt, im Sinne einer thrombophilen Diathese, sondern auch eine qualitative Ursache. Plasmin kann nämlich instabiles, also nicht durch Faktor XIII verfestigtes Fibrin wesentlich leichter angreifen, ebenso wie

fehlgebildetes Fibrin, bei dem zum Beispiel durch Schlangengiftthrombokinasen ein Fibrinopeptid A oder B abgespalten wurde. Wundheilungsstörungen bei Haemophilen weisen darauf hin, daß die Stabilisierung des Wundthrombins über Tage hin möglicherweise auch ausreichende Bildung von Faktor Xa auf endogenem Wege erfordert ("Endogene Prothrombinase" nach Marx).

Schwer verständlich erscheint, daß bei hereditären Mangelzuständen wenige Prozent Faktor XIII (unter 10 %) die Haemostase normalisieren können, wesentlich höhere Faktor-XIII-Spiegel aber die entscheidende Ursache der Wundruptur sein sollen. Es wird diskutiert, daß hierbei nur einfache Fibrinpolymere gebildet werden, bei erworbenen Mangelzuständen aber mindestens 50 % nötig sind, um ein stabiles, belastbares Gerinnsel zu bilden⁵⁴⁾. Es ist aber vielleicht denkbar, daß bei angeborenem Faktor-XIII-Mangel der Organismus "lernt" mit wesentlich weniger Faktor XIII auszukommen, zumal beim Neugeborenen 36 % der Erwachsenen-norm "physiologisch" sein sollen³⁰⁾. Obwohl wir bei unseren Patienten mit Wundruptur Faktor-XIII-Werte weit unter 50 % sahen, stellen diese Tatsachen eine Faktor-XIII-Verminderung als letztlich entscheidende Ursache der Wundruptur sehr in Frage. Der Verlauf der Erkrankung unserer Patienten ließ nicht erkennen, ob eine diskrete Wundheilungsstörung nicht schon bestand, die zwar zu anhaltender Faktor-XIII-Verminderung führte, der Platzbauch aber als Folge einer ätiologisch anderen lokalen Wunddysthrombie auftrat.

Die Faktor-XIII-Verminderung kann auf einen Verbrauch, eine reduzierte Synthese oder eine Zerstörung zurückgehen. Als wahrscheinlichste Ursache kommt bei der Häufigkeit von Infektionen bei unseren Patienten mit Wundruptur eine Umsatzstörung in Frage. Wir halten es durchaus für möglich, daß aufgepfropft auf prädisponierende Faktoren, eine Wundinfektion über eine Physio-, Pathokonsumption oder Destruktion von Gerinnungsfaktoren, Thrombin-, Plasmininhibitoren und Thrombozyten zur "Dysthrombie", zur Störung der Wundheilung und im gravierendsten Fall zur Wunddehiscenz führen kann.

In-vitro-Ergebnisse führen hier zu der Diskussion, daß entweder bakterielle Proteasen oder vielmehr - was wir vermuten - Granulozytenproteasen wie die Granulozytenelastase bzw. -kollagenase Faktor XIII und Fibrinogen neben anderen Faktoren zerstören ²⁴⁾.

Hier könnte wiederum die Fibrinolyse einen circulus vitiosus in Gang setzen, da insbesondere das Fibrinogenspaltprodukt Y über eine starke leukotaktische Wirkung ⁴²⁾ eine überschießende Leukodiapedese hervorrufen kann, die dann zum um so rascheren Verbrauch von Gerinnungsfaktoren führt.

Bedenkt man, daß alpha₁-Antitrypsin auch Elastase und Kallikrein hemmen kann ²⁹⁾, so wird die zentrale Stellung von physiologischen Plasmininhibitoren deutlich.

7.2 WIRKUNGEN AUF DAS FIBROBLASTENWACHSTUM

Zu geringe Beachtung findet in der allgemeinen Diskussion über Wundheilungsstörungen die Übergangsphase vom "provisorischen" Wundverschluß durch den Thrombus zur definitiven Wundheilung durch Fibroblastenproliferation. Schon 1961 fanden Beck et al., daß nur das durch Faktor XIII vernetzte Fibrin als Leitschiene für die Fibroblastenproliferation geeignet ist ^{4a)}.

Dazu kommt, daß Plättchenfaktoren, die unter der Einwirkung von Thrombin aus Thrombozyten freigesetzt werden, nach einmaligem Kontakt Fibroblasten zur Proliferation anregen und daß neben anderen plasmatischen Gerinnungsfaktoren vor allem Thrombin eine starke mitogene Wirkung besitzt. Möglicherweise können Thrombin- und Thrombozytenmangel auch hier die Wundheilung stören ^{24a)}.

In seiner Bedeutung noch rätselhaft ist auch das 1974 entdeckte Fibronectin, ein von Fibroblasten dauernd abgegebenes Oberflächenprotein. Im Blut konnte es 1975 als Kälte-unlösliches Globulin nachgewiesen werden. Fibronectin scheint für das koordinierte Fibroblastenwachstum notwendig

zu sein, da es Virus-transformierten Fibroblasten ihre ursprüngliche, spindelförmige Gestalt und die Fähigkeit zur Kontaktinhibition zurückgibt. Die Wechselwirkungen von Thrombin und Fibronectin werden noch diskutiert ^{24a)}.

Wir bestimmten das Kälte-unlösliche Globulin nach der Mancini-Technik und fanden bei ausgewählten Patienten Unterschiede zwischen den Gruppen. Während es in der Kontrollgruppe und der Gruppe IIa nicht unter 80 % absinkt - in Gruppe IIa praeoperativ sogar deutlich erhöht ist, sinkt es bei den Patienten mit Bauchwanddehiszenz von normalen Ausgangswerten auf 30 - 50 % ab und blieb tief bei einer Patientin, die starb.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend nehme ich an, daß die postoperative Bauchwandruptur auf einer komplexen Störung der Haemostase beruht. Das schließt signifikante Besserungen unter isolierter Faktor-XIII-Substitution nicht aus, obwohl hier möglicherweise nur ein Symptom therapiert wird. Man könnte aus theoretischen Erwägungen durchaus auch die Substitution anderer plasmatischer Faktoren wie Fibrinogen und Antithrombin III in Betracht ziehen.

Untersuchungen wurden inzwischen an einem nach unseren Kriterien ausgewählten Krankengut mit über 70 Patienten durchgeführt. In einer Doppelblind-Studie von Schramm und Schmidtler sollte die Effektivität der Faktor-XIII-Substitution überprüft werden. Nach vorläufigen Ergebnissen scheint, zumindest bei besonders gefährdeten Patienten ein günstiger Effekt zu erzielen sein ^{47b)}.

E . Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

Anhand klinisch ermittelter Risikofaktoren konnten Patienten mit erhöhter Neigung zu Wundheilungsstörungen ausgewählt werden. Bei 12 (43 %) der 28 nach klinischen Kriterien gefährdeten Patienten trat postoperativ eine Bauchwandruptur auf, die in unselektiertem Patientengut nur in 1 % aller Laparotomien vorkommt.

In einer prospektiven Studie kontrollierten wir in zweitägigem Abstand die Laparotomiewunde und untersuchten prae- und postoperativ zahlreiche haemostaseologische Parameter. Wir teilten die Patienten in eine Kontrollgruppe, I, und eine Risikogruppe, II, ein. Letztere zerfällt in Gruppe IIa, Patienten, die keine Wundruptur bekamen und Gruppe IIb, Patienten mit klinisch ermitteltem Risiko und nachfolgendem Platzbauch.

Blutbild und Globaltests zeigten keine signifikanten Veränderungen. Beim Hitzefibrinogen und den Thrombozyten stiegen in der Gruppe IIa die Werte postoperativ signifikant an, während sie in Gruppe I (beim Hitzefibrinogen auch Gruppe IIb) tief blieben.

Faktor XIII, Faktor-VIII-assoziiertes Antigen, Anti-thrombin III, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin wurden mit der Immunelektrophorese nach Laurell bestimmt. Die Methode wird detailliert beschrieben, mit anderen Methoden verglichen, und eigene Normalwerte wurden bestimmt. Bei Anti-thrombin III und Faktor XIII fallen die Werte in allen Gruppen postoperativ signifikant ab, liegen für die Patienten der Gruppe IIb aber signifikant unter denen der Vergleichsgruppen. Für die Gruppe IIa liegen sie im ganzen Verlauf zwischen Gruppe I und IIb. Für Faktor XIII werden diese Ergebnisse durch die zweite Bestimmung nach Bohn und Haupt bestätigt.

F . L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

1. Abildgaard, U., Egeberg, O.:
Thrombin inhibitory activity of fractions, obtained
by gel filtration of antithrombin-III-deficient plasma.
Scand. J. Haemat. 5 (1968) 155 - 157
2. Allgöwer, M.:
Biologische Grundlagen der Wundbehandlung.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 235 (1969) 22 - 29
- 2a. Aoki, N., Moroi, M., Matsuda, M., Tachiya, K.:
The behavior of alpha₂-plasmin inhibitor in fibrino-
lytic states.
J. clin. Invest. 60 (1977) 361 - 369
3. Barthels, M., Poliwoda, H.:
Gerinnungsanalysen.
Thieme Stuttgart 1975
- 3a. Barthels, M., Borchers, H., Poliwoda, H., Sommer, H. G.:
Untersuchung über die Auswirkung von Thrombozytopenien
auf die Fibrin-Stabilisierung.
Fortschr. Med. 95 (1977) 1281 - 1284
4. Becker, W.:
Methoden der qualitativen und quantitativen Immun-
elektrophorese.
Informationsschrift der Firma Behringwerke AG

- 4a. Beck, E., Duckert, F., Ernst, M.:
The influence of fibrin stabilizing factor on the
growth of fibroblasts in vitro and wound healing.
Thromb. Diath. Haemorrh. 6 (1961) 485 - 491
5. Biehl, H., Bohn, H., Ronneberger, H., Zwisler, O.:
Beschleunigung der Wundheilung durch Faktor XIII der
Blutgerinnung.
Arzneim. Forsch. (Drug. Res.) 21 (1971) 1429 - 1430
6. Block, W.:
Aktuelle Fragen bei Störungen der Wundheilung.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 289 (1958) 42 - 59
und 145 - 146
7. Bohn, H.:
Isolierung und Charakterisierung des fibrinstabili-
sierenden Faktors aus menschlichen Thrombozyten.
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 23 (1970) 455 - 469
8. Böttger, G.:
Ursachen und Behandlung der postoperativen Bauchwand-
ruptur und der Bauchnarbenbrüche.
Acta Chir. 235 (1969) 39 - 52
9. Böttger, G., Vorster, C.:
Die postoperative Bauchwandruptur.
Chirurg 40 (1969) 80 - 85
10. Bohn, E., Haupt, H.:
Eine quantitative Bestimmung von Faktor XIII mit
Anti-Faktor-XIII Serum.
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 19 (1968) 309 - 315

11. Braun, F., Holle, J., Kovac, W., Lindner, A.,
Spängler, H. P. :
Untersuchungen über die Replantation autologer Voll-
haut mit Hilfe von hochkonzentriertem Fibrinogen
und Blutgerinnungsfaktor XIII.
Wien. klin. Wschr. 125 (1975) 213 - 219
12. Burkhardt, H., Zellner, P. R., Möller, I.:
Faktor-XIII-Mangel bei Verbrennungen.
Chirurg 48 (1977) 520 - 523
13. Cassau, D., Siewert, R., Osten, W.:
Fibrinstabilisierung bei der vollständigen Wundde-
hiszenz.
Chirurg 40 (1969) 76 - 80
14. Dittrich, H.:
Wundheilungsstörungen.
Chirurg 42 (1971) 289 - 295
15. Duckert, F., Jung, E., Shmerling, D. H. :
A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis,
probably due to fibrin stabilizing factor deficiency.
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 5 (1960) 179
16. Fürstenberg, H. S., Schneider, B., Diamantopoulos, G.:
Faktor-XIII-Substitution bessert Wundheilung.
Medical Tribune (Österreich) 6 (1974) 1 - 16
17. Gianella, C., Vogt, B.:
Beitrag zum Problem des Platzbauchs.
Helv. chir. Acta 42 (1975) 805
18. Gierhake, F. W.:
Postoperative Wundheilungsstörungen: Untersuchungen
zur Statistik, Ätiologie und Prophylaxe.
Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York 1970

19. Gierhake, F. W., Papastavrou, K., Zimmermann, H.,
Bohn, H., Schwick, H. G. :
Prophylaxe postoperativer Wundheilungsstörungen durch
Faktor-XIII-Substitution.
Dtsch. med. Wschr. 99 (1974) 1004 - 1009

20. Gierhake, F. W., Volkmann, W., Becker, W., Schwarz, H.,
Schwick, H. G. :
Faktor-XIII-Konzentration und Wundheilung.
Dtsch. med. Wschr. 95 (1970) 1472 - 1475

21. Grabar, P., Williams, C. A. :
L'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et
immunochimiques d'un mélange de protéines; application
au sérum sanguin.
Biochim. biophys. Acta (Amst) 10 (1953) 193

22. Hahnloser, P., Lindner, E.:
Zur Genese und Prophylaxe des Platzbauches.
Helv. chir. Acta 42 (1975) 805 - 815

23. Harboe, N., Ingild, E.:
Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation
of antibody-titre.
in : Axelsen, N. H., Kroll, J., Weeke, B.:
"Quantitative Immuno-electrophoresis"
Scand. J. Immunology Suppl. 1/1973 161 - 164

24. Havemann, K., Egbring, R., Gropp, C., Schmidt, M.,
Sodomann, C. P. :
Faktor-XIII-Mangel bei akuter Leukämie des Erwachsenen:
Ergebnisse einer Substitution mit Faktor XIII.
Klin. Wschr. 55 (1977) 801 - 809

- 24a. Hörmann, H., Kühn, K.:
Das Zusammenspiel von humoralen Faktoren, extrazellulärer Matrix und von Zellen bei der Wundheilung.
Fortschr. Med. 95 (1977) 1299 - 1304
25. Hosenfeld, D., Kaiser, N.:
Das Verhalten des Faktors XIII nach Operationen.
Med. Welt 20 (1969) 286 - 288 und 1170 - 1173
26. Johansson, B. G. :
Agarose gel electrophoresis.
Skand. J. clin. Lab. Invest. 29 (1972) suppl. 124, 7 - 19
27. Kindmark, C. O., Thorell, J. I. :
Quantitative determination of individual serum proteins by radio-electroimmuno assay and use of ^{125}J -labelled antibodies.
(Application to C-reactive protein)
Skand. J. clin. Lab. Invest. 29 (1972) suppl. 124
28. Knoche, H., Schmitt, G.:
Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß des Faktors XIII auf die Wundheilung im Tierexperiment.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 26 (1976) 547 - 541
- 28a. Koie, K., Kamiya, T., Ogata, K., Takamatsu, J.:
 Alpha_2 -plasmin-inhibitor deficiency (Miyasato disease).
Lancet (1978) December 23 & 30, 1334 - 1336
29. Kunz, S., Herrschlein, H. J., Streichle, D. F., Kiders, E.:
Verhalten physiologischer Inhibitoren der Blutgerinnung und Fibrinolyse während der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett.
Med. Welt 24 (1973) 1266 - 1269

30. Künzer, W., Lütgeneier, J.:
Zur entwicklungsbedingten Abhängigkeit des Plasmagehaltes an Fibrin-stabilisierendem Faktor (FSF).
Ann. paediat. 204 (1965) 232 - 238
31. Lanz, T. v. :
Praktische Anatomie der Bauchwand.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 304 (1963) 250 - 272
32. Laurell, C. B. :
Quantitative estimation of protein by electrophoresis in antibody containing agrose gel.
Anal. Biochem. 15 (1966) 45 - 49
33. Laurell, C. B. :
Electroimmuno assay.
Skand. J. clin. Lab. Invest. 29 (1972) suppl. 124, 21 - 37
34. Lennert, K. A., Hupe, H.:
Prä- und postoperatives Verhalten der Serumproteininhibitoren α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin.
Med. Welt 24 (1973) 912 - 915
35. Letheby, B. A., Davis, R. B., Larsen, A. E. :
The effect of major surgical procedures on plasma and platelet levels of factor XIII.
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 31 (1974) 20 - 29
36. Lindner, J., Huber, P.:
Biochemische und morphologische Grundlagen der Wundheilung und ihrer Beeinflussung.
Med. Welt 24 (1973) 897 - 911
37. Mancini, G., Vaerman, J.-P., Carbonary, A. O., Heremans, J. F. :
Protides of the biological fluids.
Elsevier, Amsterdam 11 (1963) 370

38. Marx, R. :
Blutgerinnung und Koagulopathien.
in : Hornbostel, H., Kaufmann, W., Siegenthaler, W.:
"Innere Medizin in der Praxis und Klinik", Band III
G. Thieme, Stuttgart 1973
39. Marx, R. :
Haemostaseologie.
Habilitationsschrift, München 1953
40. Marx, R. :
Postoperative und posttraumatische Gerinnungsstörungen
- Erkennung und Behandlung.
Ärztliche Forschung, in Vorbereitung
41. Matras, H., Dinges, H. P., Lassmann, H., Mamoli, B.:
Zur nahtlosen interfaszikulären Nerventransplantation
im Tierexperiment.
Wien. med. Wschr. 11 (1972) 517 - 523
42. Mc Kenzie, R., Pepper, D. S., Kay, A. B. :
The generation of chemotactic activity for human leuko-
cytes by the action of plasmin on human fibrinogen.
Thromb. Res. 6 (1975) 1 - 8
43. Reitamo, J., Möller, C.:
Abdominal wound dehiscence.
Acta chir. Skand. 138 (1972) 170 - 175
44. Scheidegger, J. J. :
Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse.
Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol. 7 (1955) 103

45. Schmidtler, F., Schildberg, F. W. Schramm, W.,
Gleisner, C.:
Zur Pathogenese der postoperativen Bauchwandruptur.
Münch. med. Wschr. 119 (1977) 685 - 689
46. Schramm, W., Schaarschmidt, K., Schmidtler, F.,
Schildberg, F. W. :
Zur Pathogenese der postoperativen Bauchwandruptur.
Münch. med. Wschr. 119 (1977) 690 - 694
47. Schramm, W., Schmidtler, F., Marx, R., Schaarschmidt, K.,
Schildberg, F. W. :
Infektion in der Pathogenese der postoperativen
Bauchwanddehiszenz.
Vortrag XIX. Hamburger Gerinnungs-Symposion, Hamburg 1976
Schattauer, Stuttgart - New York 1976
- 47a. Schramm, W.:
Diskussionsbeitrag
Hamburger Haemophilie-Symposion, November 1978
- 47b. Schramm, W., Schmidtler, F.:
Doppelblindstudie
in Vorbereitung
48. Seidel, W. :
Die postoperative Bauchwanddehiszenz.
Chirurg 38 (1967) 377 - 381
49. Sokolov, S. :
Das Aufplatzen der Bauchwunde nach Laparotomien mit
Eventeration.
Ergebn. Chir. 25 (1932) 306

50. Spängler, H. P. :
Gewebeklebung und lokale Blutstillung mit Fibrinogen,
Thrombin und Blutgerinnungsfaktor XIII.
Wien. klin. Wschr. 88 (1976) Suppl. 49
51. Stathakis, N., Papayannis, A. G., Gardikas, C. D.:
Postoperative antithrombin III concentration.
Lancet (1973) February 14, 430
- 51a. Thaler, E., Kleinberger, G.:
Sepsis und Blutgerinnung.
Intensivmed. 16 (1979) 54 - 60
52. Thies, H. A., Busch, H., Koch, G., Wendebourg, R.:
Neue Erkenntnisse über die Pathogenese und Prophylaxe
des Platzbauches.
Med. Welt 6 (1967) 320 - 329
53. Tiselius, A. :
zitiert bei Weeke 55)
Trans. Faraday Soc. 33 (1937) 524 - 531
54. Wachtel, E. :
Biochemie und klinische Bedeutung des Gerinnungs-
faktors XIII (FSF).
Pharmazeut. Zeitung 118 (1973) 1571 - 1578
55. Weeke, B. :
Quantitative Immunelektrophorese I₁
"Raketenimmunelektrophorese".
Ärztl. Lab. 18 (1972) 12 - 19
56. Weeke, B. :
I₁ General remarks on principles, equipment, reagents
and procedures.
in : Axelsen, N. H., Kroll, J., Weeke, B.:
"Quantitative Immunoelectrophoresis"
Scand. J. Immunology Suppl. 1/1973 15 - 35

57. Weeke, B. :
I₂ Rocket immunoelectrophoresis.
in : Axelsen, N. H., Kroll, J., Weeke, B.:
"Quantitative Immunelectrophoresis"
Scand. J. Immunology Suppl. 1/1973 37 - 46
58. Will, R. :
Faktor-XIII-Konzentrat bei Osteotomien und Zystektomien
mit heterologen Spanimplantaten.
Zahnärztl. Welt/Reform 83 (1974) 323 - 328

L E B E N S L A U F
=====

Am 23. 5. 1953 wurde ich, Klaus Wilhelm Schaarschmidt, als Sohn des Studiendirektors Wilhelm Schaarschmidt und der Studiendirektorin Ruth Schaarschmidt, geb. Friedrich, in München geboren. Nach dem Besuch der Knabenvolkschule und des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges des Chiemgaugymnasiums in Traunstein/Bayern legte ich 1972 die Reifeprüfung ab. Das Medizinstudium erfolgte an den Universitäten München Ludwig-Maximilians-Universität und Leeds Medical School.

